



**Joana Isabel**  
**Ferreira Alexandre**

Perfil de Resistência a Antibióticos em Isolados de  
Doentes Oncológicos





**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia.  
Ano 2010

**Joana Isabel  
Ferreira Alexandre**

## **Perfil de Resistência a Antibióticos em Isolados de Doentes Oncológicos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Dr. Carlos José Diogo Faria Cortes e a co-orientação da Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.



**O júri**  
Presidente

Prof. Doutora Adelaide Almeida  
Professora Auxiliar da universidade de Aveiro

Dr. Carlos José Faria Diogo Cortes  
Médico Assistente Hospitalar, Especialidade em Patologia Clínica do Instituto  
Português de Oncologia Francisco Gentil Coimbra EPE

Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveira  
Investigadora Pós-Doutoramento,, CESAM

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro



## **Agradecimentos**

Aos meus pais, pelo amor incondicional e porque são a base para a pessoa na qual me tornei hoje.

À minha irmã e minha melhor amiga Marta, pelo apoio e presença em todas as etapas da minha vida.

Ao meu querido Francisco, pelo amor, incentivo e contributo imensurável para o alcance deste objectivo.

Ao Dr. Frederico Valido, Director do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, E.P.E. (IPOCFG, E.P.E.), pela colaboração e pronta disponibilização de recursos materiais e humanos.

À Professora Doutora Sónia Mendo, pela orientação científica desta Tese de Mestrado, pelas críticas e opiniões durante a preparação do manuscrito.

Ao Dr. Carlos Cortes pelos ensinamentos transmitidos e orientação que me prestou ao longo da feitura deste trabalho.

A todos os colegas do Serviço de Patologia Clínica, pela amizade, compreensão, experiência e profissionalismo demonstrados que contribuíram, de uma forma ou de outra, para a realização deste trabalho. Um especial agradecimento à colega, mas principalmente amiga, Mafalda Costa pela amizade e palavras de encorajamento.





## palavras-chave

## resistência aos antibióticos; infecção hospitalar.

## resumo

Cerca de 25 a 50% dos doentes internados são sujeitos a terapias antibióticas.

O uso excessivo e durante longos períodos de tempo de antibióticos associado à toxicidade dos mesmos causam efeitos adversos muito significativos tais como emergência de microrganismos resistentes, aumento da morbidade e mortalidade, aumento das infecções associadas e, também, aumento dos custos associados à prestação de cuidados de saúde. A resistência aos antibióticos em meio hospitalar é uma ameaça para a saúde pública e compromete o tratamento apropriado dos doentes infectados, especialmente em doentes oncológicos.

Com o presente trabalho pretendeu-se identificar quais os microrganismos mais comuns envolvidos na infecção hospitalar e os seus perfis de resistência aos antibióticos. Os microrganismos foram recolhidas de doentes oncológicos do internamento do IPOCFG, E.P.E., durante o período de Setembro de 2009 a Fevereiro de 2010,

*E.coli* foi o microrganismo mais isolado (16,0%), seguido por *Staphylococcus coagulase negativa* (13,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (12,8%), *Staphylococcus aureus* (12,8%), *Candida spp.* (9,1%), *Enterococcus faecalis* (9,1%), *Klebsiella pneumoniae* (7,0%) e *Proteus mirabilis* (5,9%).

A infecção foi mais prevalente em homens do que em mulheres e a média de idades da população em estudo foi 62,9 anos.

O tipo de infecção mais comum foi a infecção respiratória. Seguem-se a infecção urinária e a infecção sanguínea.

*Klebsiella pneumoniae* foi resistente à norfloxacina e cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, e 3<sup>a</sup> geração. *Proteus mirabilis* foi resistente à tetraciclina e ampicilina. *E.coli* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram baixas taxas de resistência aos antibióticos (inferiores a 58,6% e 41,7% respectivamente). 20% de *E.coli* e 76,9% de *Klebsiella pneumoniae* são produtores de ESBL's. *Staphylococcus coagulase negativa* foi resistente à benzilpenicilina e oxacilina. *S.aureus* foi resistente à benzilpenicilina, oxacilina, aos antibióticos do grupo MLS e quinolonas. *Enterococcus faecalis* foi resistente às cefalosporinas de 2<sup>a</sup> geração; clindamicina, tetraciclina e quinupristina/dalfopristin. Dos *S.aureus* isolados, 79,2% são MRSA.



## keywords

**antibiotics resistance; hospital infection.**

## abstract

It is reported that 25-50% of inpatients receive antimicrobial agents. In addition to the toxicity of the administered drug, excessive and long-term administration of antimicrobials causes significant adverse effects, such as emergence of resistant microorganisms, increase in morbidity and mortality and associated infections. It also results in a increase in healthcare costs. Antibiotic resistance is a threat to public health and compromises appropriate therapy of infected patients, especially in oncologic patients.

The aim of the present study was to identify the most common microorganisms involved in hospital infection and theirs resistance profile to antibiotics. Strains were isolated from oncologic inpatients of the IPOCFG, E.P.E., during the period from September 2009 to February 2010.

*E.coli* was the more isolated strain (16,0%) followed by coagulase negative staphylococci (13,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (12,8%), *Staphylococcus aureus* (12,8%), *Candida spp.* (9,1%), *Enterococcus faecalis* (9,1%), *Klebsiella pneumoniae* (7,0%) and *Proteus mirabilis* (5,9%).

Infection was more prevalente in male patients than in women and the mean age of the study populations was 62, 9 years.

Respiratory tract infections were the most common, followed by urinary tract and blood stream infections. *Klebsiella pneumoniae* was resistant to norfloxacin and 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins. *Proteus mirabilis* was resistant to tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole and ampicillin. *E.coli* and *Pseudomonas aeruginosa* presented low resistance rates to antibiotics (less than 58,6% and 41,7% respectively).

20% and 76,9% are ESBL-producing *E.coli* and *Klebsiella pneumoniae* respectively.

Coagulase negative staphylococci were resistant to benzylpenicillin and oxacillin. *S.aureus* was resistant to benzylpenicillin, oxacillin, to the MLS group and to quinolones. *Enterococcus faecalis* were resistant to 2<sup>nd</sup> generation cephalosporins, clindamycin, tetracycline and quinupristin/dalfopristin. 79,2% were found to be MRSA.

## **I – INTRODUÇÃO**

<b>1. Infecção hospitalar</b>	<b>3</b>
1.1 Microrganismos associados à infecção hospitalar	5
1.2 Uso racional de antibióticos em meio hospitalar	6
1.3 Resistência aos antibióticos em meio hospitalar	8
<b>2. O doente oncológico</b>	<b>10</b>
<b>3. Mecanismos de acção dos antibióticos</b>	<b>14</b>
<b>4. Mecanismos de resistência aos antibióticos</b>	<b>16</b>
<b>5. Antibióticos antiparietais</b>	<b>18</b>
5.1 Antibióticos $\beta$ -lactâmicos	20
5.1.1 Mecanismo de acção dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos	32
5.1.2 Resistência bacteriana aos $\beta$ -lactâmicos	33
5.1.3 $\beta$ – lactamases	34
5.2 Vancomicina	37
5.2.1 Enterococos resistentes à vancomicina	38
5.2.2 – VRSA/VISA	39

<b>II – OBJECTIVOS</b>	41
<b>III – MATERIAL E MÉTODOS</b>	45
1. Caracterização da população estudada	47
2. Identificação dos microrganismos	48
3. Testes de sensibilidade aos antibióticos	54
<b>IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	57
1. Microrganismos isolados	59
2. <i>E.coli</i>	62
3. <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	68
4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71
5. <i>S. aureus</i>	75
6. <i>Candida spp.</i>	80
7. <i>Enterococcus faecalis</i>	82
8. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	85
9. <i>Proteus mirabilis</i>	88
10. <i>Acinetobacter baumannii</i>	92
<b>V – CONCLUSÕES FINAIS</b>	95
<b>VI – BIBLIOGRAFIA</b>	101

## Índice de Figuras

Figura 1: Microrganismos com resistência aos antibióticos encontrados num estudo de vigilância de infecções hospitalares em 95 hospitais da Europa. (Retirado de Lepape, A. <i>et al.</i> 2009).	10
Figura 2: Tipos de transferência genética entre bactérias.	17
Figura 3: Estrutura química da penicilina G.	21
Figura 4: Estrutura química da meticilina.	23
Figura 5: Estrutura química da ampicilina.	24
Figura 6: Estrutura química da amoxicilina.	24
Figura 7: Estruturas químicas de derivados alfacarboxílicos das penicilinas antipseudomonas a) carbenicilina e b) ticarcilina.	25
Figura 8: Estrutura química das aciloaminopenicilinas a) azlocilina, b) mezlocilina, c) piperacilina e d) apalcilina.	25
Figura 9: Estrutura básica das cefalosporinas.	26
Figura 10: Estrutura química das cefalosporinas.	28
Figura 11: Estrutura química do aztreonamo.	29
Figura 12: Estrutura química do imipenemo.	30
Figura 13: Estrutura química do meropenemo.	30
Figura 14: Estrutura química do ertapenemo.	30

Figura15: Estrutura química dos inibidores das $\beta$ -lactamases.	32
Figura 16: Estrutura química da vancomicina.	38
Figura 17: Distribuição dos 187 microrganismos isolados de acordo com o produto biológico de onde foram recolhidos: urina; sangue; secreções respiratórias; exsudato e outros.	60
Figura 18: : Distribuição dos 187 microrganismos isolados de acordo com o serviço em que foram isolados: Oncologia Médica; Ginecologia; Cirurgia; Cirurgia Cabeça e Pescoço; Cuidados Paliativos; Urologia; Radioterapia e Unidade de Cuidados Intermédios.	61
Figura 19: Distribuição dos isolados de <i>E.coli</i> de acordo com o local de infecção: sangue; secreções respiratórias; líquido peritoneal; urina e exsudato.	63
Figura 20 Distribuição dos isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa de acordo com o local de infecção: sangue; ponta de cateter; secreções respiratórias; urina; exsudato e líquido peritoneal.	69
Figura 21: Distribuição dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de acordo com o local de infecção: sangue; ponta de catéter; secreções respiratórias; urina e exsudato.	72
Figura 22: Distribuição dos isolados de <i>S.aureus</i> isoladas de acordo com o local de infecção: exsudato; urina; sangue e secreções respiratórias.	76
Figura 23: Distribuição das espécies de <i>Candida spp.</i> isoladas de acordo com o local de infecção: líquido peritoneal; urina; fezes; secreções respiratórias.	81
Figura 24: Distribuição dos isolados de <i>Enterococcus faecalis</i> de acordo com o local de infecção: sangue; secreções respiratórias; líquido peritoneal; urina e exsudato.	83

Figura 25: Distribuição dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* de acordo com o local de infecção: sangue; secreções respiratórias; ponta de cateter; urina e exsudato. 86

Figura 26: Distribuição dos isolados de *Proteus mirabilis* de acordo com o local de infecção: urina; exsudato e secreções respiratórias. 89



## Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais grupos de antibióticos usados na terapêutica.	15
Tabela 2: Quadro resumo com os antibióticos pertencentes a cada uma das gerações de cefalosporinas.	27
Tabela 3: Classificação das $\beta$ -lactamases relacionando o perfil do substrato e dos inibidores das $\beta$ -lactamases com a sua estrutura molecular.	34
Tabela 4: Meios de cultura, condições de incubação e necessidade de realização da coloração de Gram e exame directo (sem coloração) dos produtos biológicos dos quais foram isolados os microrganismos estudados.	48
Tabela 5: Conteúdo dos poços das cartas GP.	51
Tabela 6: Conteúdo dos poços das cartas GN.	52
Tabela 7: Conteúdo dos poços das cartas YST.	53
Tabela 8: Espécies isoladas e a sua prevalência durante o período de Setembro de 2009 a Fevereiro de 2010.	59
Tabela 9: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de <i>E.coli</i> .	64
Tabela 10: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> .	70
Tabela 11: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	73

Tabela 12: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de *S.aureus*. 77

Tabela 13: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de *Enterococcus faecalis*. 84

Tabela 14: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de *Klebsiella pneumoniae*. 87

Tabela 15: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de *Proteus mirabilis*.. 90

## Abreviaturas

**6-APA** - ácido 6-aminopenicilânico

**7-ACA** - ácido 7-aminocefalosporânico

**CLED** – gelose de cistina lactose deficiente em electrólitos

**CNA** - gelose com 5% de sangue de carneiro, ácido nalidíxico e colistina.

**DNA** – ácido desoxirribonucleico

***E. coli*** - *Escherichia coli*

**EDTA** - ácido etileno-diamino-tetraacético

**ESBL** -  $\beta$ -lactamases de largo espectro

**IPOCFG, E.P.E.** - Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E.

**IH** – Infecção Hospitalar

**IRT** - TEM  $\beta$ -lactamases resistentes à inibição

**MIC** - Minimum Inhibitory Concentration

**MLS** - macrólidos, lincosamidas e estreptograminas

**MRSA** – *S. aureus* resistentes à meticilina

**NAG** - N-acetilglucosamina,

**NAM** - ácido N-acetilmurâmico

**PBP's** - proteínas receptoras de penicilina

**PVX** - gelose de chocolate com suplemento polivitex

*S. aureus* - *Staphylococcus aureus*

**VRSA/VISA** – *S. aureus* resistentes/resistência intermédia à vancomicina

## **Introdução**



## 1. Infecção hospitalar

A infecção hospitalar (IH) é um problema de saúde pública. O impacto deste tipo de infecções é enorme, tanto em termos de morbilidade e mortalidade dos doentes, como em termos sociais e económicos, prolongando-se os dias de internamento e, inexoravelmente, conduzindo a um aumento dos custos da estadia no hospital. Estima-se que, em países desenvolvidos, as taxas de IH variem num intervalo de 5 a 10% das hospitalizações totais, implicando um aumento no período de internamento de cerca de 5 a 10 dias (Bergone – Bérézin, E. 1995; Horan, Teresa C. *et al.* 1986).

A infecção nosocomial é aquela que ocorre após a admissão hospitalar, sem que existam provas que esta estava presente ou em período de incubação na altura da admissão do doente, e que se manifesta durante o internamento ou após a alta. É, portanto, uma complicação da hospitalização, um efeito adverso dos cuidados de saúde. São consideradas infecções nosocomiais as infecções ocorridas 48 horas após o internamento e também as infecções ocorridas no local operatório até 30 dias (nos casos de introdução de prótese esse prazo pode ir até 1 ano). No entanto, cada infecção deve ser avaliada individualmente, sendo necessário ter em conta os tempos de incubação específicos para cada microorganismo (Andersen, Bjorg *et al.* 2009).

Doentes com infecções adquiridas na comunidade são frequentemente admitidos nos hospitais, e a infecção pode ser espalhada quer por contacto directos (entre doentes, profissionais de saúde e visitas) quer por contacto indirecto (comida, água, aerossóis, medicação e aparelhos médicos –fômites) (Andrade, Denise *et al.* 2000).

Os doentes hospitalizados apresentam um maior risco de infecção por várias razões.

A predisposição de um doente para o risco de infecção é fortemente determinada por certas características pessoais e exposições a que um indivíduo está sujeito. Estes riscos estão divididos em duas categorias: factores intrínsecos e factores extrínsecos de susceptibilidade à infecção (Emori, T. Grace *et al.* 1993).

Os factores intrínsecos de susceptibilidade são aqueles inerentes ao doente derivado à sua patologia de base e ao seu estado geral. São exemplos de factores intrínsecos de susceptibilidade: idade (doentes prematuros/muito jovens ou idosos constituem grupos de risco); sexo (no caso das infecções urinárias, em que as mulheres têm uma maior predisposição); severidade da patologia de base (é fácil de compreender que quanto mais grave for a patologia de base mais frequente é o recurso a dispositivos médicos e procedimentos invasivos); doentes sujeitos a quimioterapias imunossupressivas (se o doente é imunocomprometido, os microrganismos que normalmente não são patogénicos, pertencentes à flora normal, podem causar doenças); perda da integridade da pele (queimaduras, psoríase etc.) e má nutrição assim como o mau estado geral (trauma, obesidade etc.) (Emori, T. Grace e tal. 1993).

Os factores extrínsecos de susceptibilidade podem residir nos profissionais de saúde (práticas individuais de prestação de cuidados de saúde) ou na própria instituição (práticas de prestação de cuidados de saúde de todo o hospital). Os factores mais importantes e mais estudados são as intervenções médicas de alto risco (cirurgias, broncofibroscopias, aspirações de secreções, etc.) e o uso de dispositivos médicos invasivos (sondas nasogástricas, sondas vesicais, sondas nasais, catéteres venosos centrais, tubos orotraqueais, ventiladores, etc.). No que concerne às cirurgias, vários factores devem ser tidos em consideração, tais como duração e tipo de cirurgia, grau de contaminação microbiológica do bloco operatório e o risco intrínseco do paciente. Por outro lado, a decisão para recorrer a dispositivos médicos e a duração da sua utilização deve ser conscienciosa, ponderada e baseada na condição do doente e respectiva terapêutica. Nem todas as infecções associadas aos factores de risco extrínseco são possíveis de prevenir, uma vez que os benefícios decorrentes do uso dos dispositivos médicos e a necessidade de uma cirurgia podem ultrapassar o risco de infecção. São portanto necessários e ao mesmo tempo de extrema importância para o sucesso da cura e terapêutica dos doentes (Emori, T. Grace e tal. 1993).

Em suma, um dos aspectos que condiciona a susceptibilidade de um doente infectar diz respeito ao maior ou menor grau de invasibilidade que as técnicas de diagnóstico ou terapêutica acarretam. Além dos factores acima assinalados, há que ter em mente que o



próprio ambiente hospitalar favorece a aquisição de microrganismos resistentes aos antibióticos, o que complica o tratamento das infecções, conduzindo ao natural aumento do risco de contrair uma infecção (Emori, T. Grace e tal. 1993).

Por último, é importante enfatizar a estratégia de abordagem da IH. Apesar de vista, tradicionalmente, como responsabilidade exclusiva dos hospitais, toda a estratégia de abordagem da IH terá tendência a extravasar para a comunidade, dada a mudança de perfil da prestação de cuidados hospitalares: altas cada vez mais precoces; internamentos cada vez mais curtos; cada vez mais procedimentos realizados em sistema de ambulatório; transferência da continuidade de cuidados de saúde para a comunidade (principalmente de convalescença) e pressão para se manterem taxas de ocupação de 100% e até mesmo superiores (Palavra, Filipe *et al.* 2010).

### **1.1. Microrganismos associados a infecção hospitalar**

Os microorganismos relacionados com a IH foram variando ao longo do tempo, devido a factores ambientais e à pressão selectiva associada ao uso de antibióticos. Na era “pré antibiótica” os *Streptococcus pneumoniae* e os *Streptococcus* do grupo A (*Streptococcus pyogenes*) eram os microrganismos mais frequentemente encontrados em ambiente hospitalar (De Moraes, Bianca Aguiar *et. al.* 2000).

Os primeiros surtos de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), resistentes às penicilinas verificaram-se entre 1960 e 1980. Outros microrganismos emergiram neste período: *S. aureus* resistentes à oxacilina, bem como Gram negativos fermentadores produtores de  $\beta$ -lactamases. Depois da década de 80 foram relatados casos de Gram negativos não fermentadores, *Candida sp.* e alguns tipos de vírus (De Moraes, Bianca Aguiar *et. al.* 2000).

Estudos mais recentes demonstram que as bactérias frequentemente isoladas a nível hospitalar são *Escherichia coli* (*E.coli*) e *S.aureus*. Existem outros microrganismos que têm uma relevância importante na IH, pois aparecem com alguma frequência associados a infecções nosocomiais, são eles: *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella*

*pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. As infecções por fungos (*Candida sp.*) também são referenciadas quando se fala em IH, no entanto não registam taxas de prevalência muito elevadas (Abdel-Fattah 2005; De Moraes, Bianca Aguiar *et al.* 2000)

Independentemente do tamanho e tipo de hospital, as infecções associadas a cada um dos sistemas orgânicos são semelhantes entre hospitais: infecções do trato respiratório; infecções do trato urinário; infecções de feridas cirúrgicas e infecções da corrente sanguínea. De uma forma geral, os microrganismos associados a pneumonias são bacilos Gram negativos (especialmente *Pseudomonas aeruginosa*). *E.coli* é o microrganismo mais comum em doentes com infecções urinárias e *S.aureus* é o principal agente responsável pela infecção de feridas cirúrgicas, sendo também causador de infecções da corrente sanguínea (Andersen, Bjorg *et al.* 2009).

Em termos hospitalares, as maiores taxas de infecção verificam-se nas unidades de cuidados intensivos, nas unidades de cirurgias e nas unidades neonatais de cuidados intensivos (Emori, T. Grace *et al.* 1993).

## **1.2. Uso racional de antibióticos em meio hospitalar**

O uso racional de antibióticos é uma das maiores preocupações da medicina moderna. Para uma boa prática deve-se ter em conta dois aspectos fundamentais: seleccionar o antibiótico adequado, na dosagem e duração apropriada (de acordo com o tipo de infecção e tipo de microrganismo que a causou) e minimizar a emergência de resistências ao mesmo tempo que se providenciam os melhores cuidados de saúde possíveis a um custo razoável. Ou seja, idealmente, uma boa prática de prescrição de antibióticos deve primar pela escolha do antibiótico mais eficaz, menos tóxico e menos dispendioso para o tempo estritamente necessário para curar uma infecção. Dada a importância da prescrição de antibióticos há já vários hospitais com comissões de antibióticos que definem linhas de racionalização e orientações para a prescrição de antibióticos.

O uso adequado e apropriado de antibióticos por razões terapêuticas engloba os seguintes casos: uso específico (quando se conhece o microrganismo em causa e as suas sensibilidades aos antimicrobianos – suportado por informação fornecida pelo Laboratório); uso empírico e uso profilático (Tunger, Ozlem *et al.* 2009).

Em casos de urgência, havendo suspeita clínica de infecção, assume obviamente importância a prescrição de um antibiótico que, à partida, deverá ser o que, na dose adequada, mais provavelmente será capaz de resolver a situação – antibioterapia empírica. Se por um lado a escolha do fármaco a prescrever tem que ter em consideração as particularidades epidemiológicas e clínicas do caso em consideração, não menos importante será, num regime de internamento, o conhecimento da flora local que, mais provavelmente, poderá ser implicada na doença (Palavra, Filipe *et al.* 2010; Tunger, Ozlem *et al.* 2009).

A antibioterapia profilática pode ser definida como o uso profilático de antibióticos em pacientes que não apresentam sinais ou sintomas de infecções, com o objectivo de prevenir o seu surgimento em situações de alto risco (pacientes portadores de determinadas doenças e/ou que são submetidos a procedimentos que favorecem o surgimento de infecções). O uso dos antibióticos para fins profiláticos é basicamente indicado nas seguintes situações: quando a infecção a ser prevenida é bastante comum embora não ponha em risco a vida do paciente ou quando é considerada rara mas potencialmente fatal. O que se quer prevenir são os quadros infecciosos à distância em pacientes de risco, assim como infecções no local na própria ferida cirúrgica. Infelizmente, a antibioterapia profilática por vezes é inapropriada (atrasos na administração dos antibióticos, duração excessiva do tratamento e antibiótico não adequado), facto que pode contribuir para o aumento de resistências a nível hospitalar (Zhang y. *et al.* 2006).

Alguns estudos mostram que as cefalosporinas de terceira geração são usadas em grande escala nas antibioterapias empíricas e profiláticas. De facto, esta classe de

antibióticos é usada com mais frequência e de forma irracional e indevida (Pereira, L. P. *et al.* 2004).

As principais razões que continuam a contribuir para o uso irracional de antibióticos são: diagnóstico errado da infecção (o que leva a uma prescrição desnecessária de antibióticos); via de administração inadequada; escolha errada do antibiótico e dose e duração não apropriados (Tunger, Ozlem *et al.* 2009).

### **1.3. Resistência aos antibióticos em meio hospitalar**

Cerca de 25 a 50% dos doentes internados são sujeitos a terapias antibióticas. Estima-se que o custo associado ao uso de antibióticos em meio hospitalar seja de aproximadamente de um terço do orçamento total das farmácias hospitalares (Miyawaki, Koji *et al.* 2010).

O uso excessivo e durante longos períodos de tempo de antibióticos associado à toxicidade dos mesmos causam efeitos adversos muito significativos tais como emergência de microrganismos resistentes, aumento da morbidade e infecções associadas e, conseqüentemente, aumento dos custos dos tratamentos (Miyawaki, Koji *et al.* 2010).

Há vários estudos que demonstram que muitas vezes os antibióticos são usados de forma inapropriada e pensa-se que entre 30 a 50% destas terapias são desnecessárias visto que, muitas vezes os antibióticos são prescritos sem que haja provas de infecção (Hecker, M. T. *et al.* 2003).

A resistência aos antibióticos em meio hospitalar é, portanto, uma ameaça para a saúde pública e compromete o tratamento apropriado dos doentes infectados. Com efeito, durante a prática clínica, os médicos são muitas vezes confrontados com doentes infectados por microrganismos para os quais não há tratamento adequado ou os que há já são limitados. Por isso, e sem grandes surpresas, a resistência aos antibióticos é

apontada pelos médicos como a maior ou uma das mais significativas dificuldades na sua prática clínica (Lepape, A. *et al.* 2009).

Um estudo europeu elaborado em 2009, referente à vigilância de infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos e feito em 95 hospitais de 24 países da Europa (entre eles 12 hospitais Portugueses), revelou que os microrganismos que aparecem com mais frequência associados a infecção são os seguintes: *S.aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *Enterobacteriaceae* resistentes a cefalosporinas de terceira geração (como é o caso de *E.coli*, *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.*). Informação corroborada pelo gráfico da Figura 1. (Lepape, A. *et al.* 2009).

Foram também detectados casos de *S.aureus* resistentes/resistência intermédia à vancomicina (VRSA/VISA); *Enterococcus spp.* resistentes à vancomicina e *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina mas numa percentagem muito mais baixa. No que concerne às bactérias Gram negativo, foram encontradas resistências noutros microrganismos, mas com menos prevalência: *Enterobacteriaceae*; *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* resistentes aos carbapenemos. Como pode ser observado no gráfico da Figura 1 (Lepape, A. *et al.* 2009).

Dada a maior prevalência e emergência de microrganismos com resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, mais à frente vai ser desenvolvido este tema.

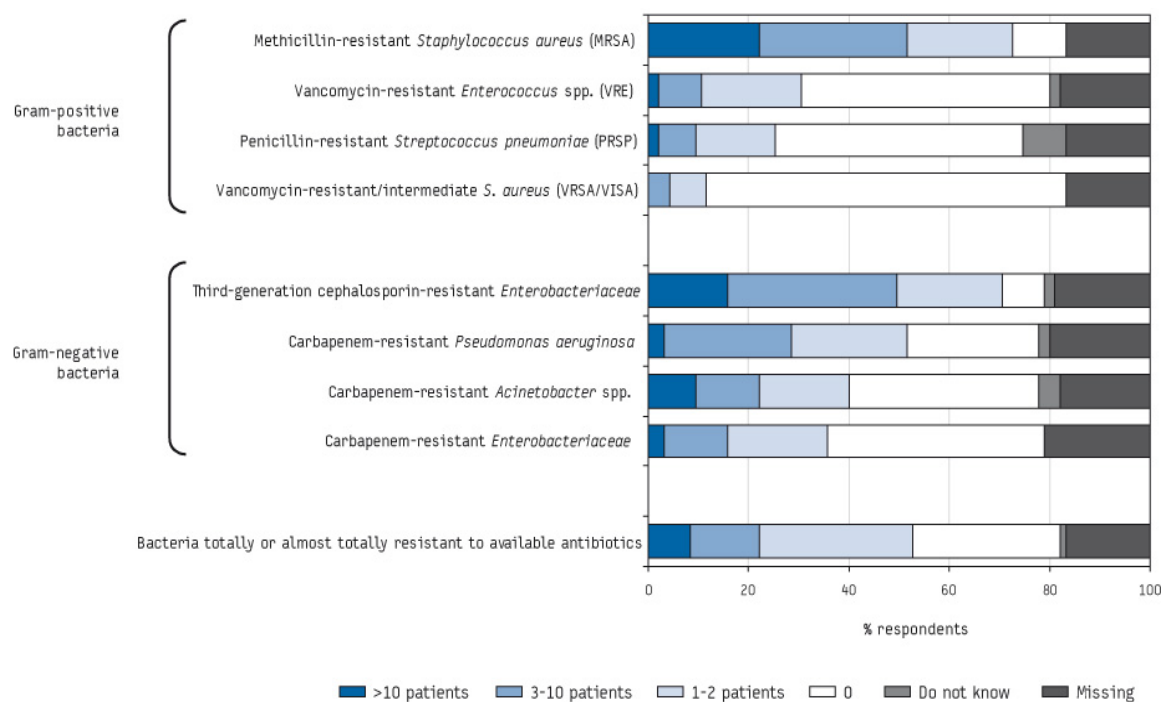


Figura 1: Microrganismos com resistência aos antibióticos encontrados num estudo de vigilância de infeções hospitalares em 95 hospitais da Europa. (Retirado de Lepape, A. *et al.* 2009).

Se considerarmos o aumento crescente de doentes idosos e imunocomprometidos, para além de uma maior utilização de dispositivos invasivos para o tratamento, facilmente se compreende também o aumento das IH, da prescrição de antibióticos e, consequentemente, de resistências cada vez maiores aos fármacos que ainda vão estando disponíveis. As resistências aos antibióticos assumem, para determinadas estirpes, um carácter verdadeiramente alarmante e o desenvolvimento de novos fármacos não acompanha a velocidade de evolução das multiresistências (Palavra, Filipe *et al.* 2010).

## 2. O doente oncológico

As infeções são frequentes nos doentes oncológicos como consequência das alterações do sistema imune derivadas da doença e do próprio tratamento. A histopatologia do tumor é um importante factor na determinação da magnitude das

alterações da função imunológica, estas alterações traduzem-se no aumento da frequência, severidade e duração da infecção e predispõe o doente oncológico para infecções por microrganismos específicos (Thomas, C. R. *et al.* 1994).

A neutropénia é um dos efeitos secundários mais comuns resultantes da quimioterapia e é verificada em cerca de 40% dos doentes oncológicos. A neutropenia é um número anormalmente baixo de neutrófilos (principal sistema de defesa celular do corpo). Dado que os neutrófilos geralmente representam mais de 70 % dos glóbulos brancos, uma diminuição na quantidade de glóbulos brancos significa habitualmente que existe uma diminuição no número total de neutrófilos. Quando a quantidade de neutrófilos cai abaixo de 1000 por microlitro, aumenta em certa medida o risco de infecção e, quando cai abaixo dos 500 por microlitro, o risco de infecção aumenta consideravelmente (Rabagliati, Ricardo B *et al.* 2008).

O risco de infecção é multifactorial e inclui o grau e duração da neutropénia, o estado das barreiras naturais (mucosa oral, pele, etc.) e outras alterações nas funções fagocíticas e imunológicas. O hospedeiro imunocomprometido é susceptível a um largo espectro de microrganismos e está em risco para uma multiplicidade de infecções. Devido à frequência de infecções e subsequente tratamento com antibióticos tem-se verificado a emergência de resistência aos antibióticos. São vários os factores que influenciam os microrganismos envolvidos no processo infeccioso: o tipo de alteração do sistema imune do hospedeiro como consequência da sua doença e respectivo tratamento; o tipo e modo de desempenho dos procedimentos invasivos de diagnóstico e terapêutica a que o doente é sujeito; integridade e quebra das barreiras protectoras do paciente e o tipo de infecção em causa – adquirida no hospital ou na comunidade (Thomas, C. R. *et al.* 1994).

As alterações do estado de saúde do paciente oncológico (devidas à doença ou tratamento) podem mascarar os sinais clínicos característicos de infecção. Assim, o perigo iminente é que as pequenas infecções possam, inicialmente, passar despercebidas e dar origem a infecções muito mais perigosas, graves e fulminantes com uma morbilidade e mortalidade significativas. As manifestações clínicas de infecção podem

variar desde sintomas ligeiros e mais encontrados na rotina – febres, mialgia, taquicardia, dispneia, irritabilidade e letargia- até sintomas mais graves que podem ameaçar a vida dos doentes – choque séptico, acidose respiratória, hemorragias gastrointestinais e coagulação intravascular disseminada (Thomas, C. R. *et al.* 1994).

A avaliação de um doente febril neutropénico (menos de 1000 neutrófilos por microlitro e 38,5 °C) é então uma situação de urgência e reveste-se de uma enorme importância quando comparada com os custos que advêm a uma posterior infecção, bem como a morbilidade e mortalidade a ela associada. Esta avaliação deve incluir: um minucioso exame físico e uma correcta história clínica do paciente; radiografia ao tórax; análises ao sangue (perfil bioquímico e hematológico) e culturas microbiológicas de urina e sangue (nos doentes com catéteres venosos centrais as hemoculturas devem ser feitas quer nas veias da flexura quer no catéter). Devem também ser pedidas análises microbiológicas dos locais ou dos produtos biológicos onde há suspeita de infecção (por exemplo um exsudato de uma ferida ou secreção respiratória) (Thomas, C. R. *et al.* 1994).

A terapia antibiótica empírica num doente febril neutropénico é um princípio universalmente aceite. Num doente em risco deve ser rapidamente determinado: o número e o espectro da antibioterapia (monoterapia ou terapia combinada); a via de administração (oral ou parentérica) e o local de tratamento (internamento ou ambulatório). São considerados doentes de baixo risco os pacientes de ambulatório em bom estado geral, sem morbilidade grave e pequena duração de episódios de neutropénia não recorrentes (Rabagliati, Ricardo B *et al.* 2008).

Para a escolha do(s) antibiótico(s) a utilizar deve-se ter em conta os seguintes aspectos muito importantes: espectro de actividade alargado contra um vasto leque de microrganismos; elevados níveis bactericidas; eficácia comprovada mesmo na ausência de neutrófilos e baixo potencial de emergência de resistência de microrganismos resistentes aos antibióticos.



Os doentes considerados de alto risco devem ser imediatamente internados de forma a receber terapia antibiótica parentérica. Nos episódios pouco complicados deve ser considerada uma monoterapia com a utilização de um antibiótico  $\beta$ -lactâmico antipseudomonas, (ticarcilina, piperacilina) ou cefalosporinas ou carbapenemos. Nos episódios mais complicados deve ser considerada uma terapia combinada, associando um  $\beta$ -lactâmico com um aminoglicosídeo ou uma quinolona. Os doentes em que a neutropenia persiste, com ou sem febre, mesmo após administração de antibióticos de largo espectro, são aqueles em risco de desenvolver uma micose. De facto, há uma certa relutância em iniciar a terapia empírica antifúngica devido à toxicidade da anfotericina B, no entanto, recentes investigações sugerem que o uso empírico deste antibiótico pode ser útil nos doentes que presumivelmente possam ter uma infecção fúngica (Bodey, G.P. 1997, Lyman, Gary H. 2010).

As *guidelines* gerais no que diz respeito ao uso da antibioterapia empírica em doentes oncológicos indicam que a terapia deve ser continuada até que a neutropenia se resolva ou deve ser no mínimo 10 a 14 dias nos doentes que continuam com neutropenia com ou sem febre. Por seu lado a antibioterapia empírica antifúngica deve ser considerada: nos casos de doentes que continuam febris e com neutropenia apesar do uso de antibióticos de largo espectro durante 7 a 14 dias; nos doentes que têm episódios recorrentes de febre; nos doentes que pioram de dia para dia apesar da antibioterapia e nos doentes com sintomas que sugerem uma possível infecção por fungos (Lyman, Gary H. 2010).

Há no entanto alguns pontos de controvérsia acerca da antibioterapia empírica que são alvo de debate: o uso de uma terapia combinada *versus* monoterapia; duração da terapia; inclusão da vancomicina como parte inicial da terapia; o tempo que deve decorrer até iniciar a terapia antifúngica e identificar os doentes que devem recebê-la e a eficácia da antibioterapia profilática oral (Lyman, Gary H. 2010).

A antibioterapia profilática tem vindo a demonstrar alguma eficácia na redução do risco dos episódios febris em doentes neutropénicos com cancro. No entanto, esta terapia está associada a uma toxicidade adicional para os doentes e à emergência de

microrganismos resistentes aos antibióticos. Embora a eficácia que a profilaxia possa ter nos doentes de alto risco e naqueles que têm graves complicações médicas decorrentes de episódios de neutropenia febril, associações como a Infectious Disease Society of America e a American Society of Clinical Oncology desaconselham a antibioterapia profilática usada na rotina (Lyman, Gary H. 2010).

### **3. Mecanismos de acção dos antibióticos**

O termo antibiótico foi criado por Waksman em 1942 para denominar todos os compostos naturais produzidos por microrganismos, que inibem o crescimento microbiano (bacteriostáticos) ou que têm efeito microbicida (bactericidas). Os antibióticos naturais distinguem-se dos antibióticos sintéticos e semi-sintéticos porque são produtos do metabolismo secundário dos microrganismos (actinomicetes, fungos e bactérias). Dado o número crescente de moléculas de síntese, presentemente, o termo antibiótico engloba todos os compostos naturais ou de síntese com propriedades de antibiose. O antibiótico ideal deveria ter as seguintes características: estabilidade *in vivo*; eficaz apenas no agente causador da infecção sem causar efeitos laterais ou toxicidade no hospedeiro (toxicidade selectiva); boa taxa de absorção e biodisponibilidade; boa taxa de eliminação; administração cómoda e baixo preço (Sousa, J. C. 2006).

A actividade antimicrobiana de um composto pode ser quantificada *in vitro* com base na determinação da concentração mínima do composto capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo – concentração inibitória mínima ou "Minimum Inhibitory Concentration" (MIC). O grau de eficácia de um antibiótico é caracterizado como: “sensível”, “sensibilidade intermédia” e “resistente”, dependendo do valor do MIC. Um microrganismo é considerado sensível a determinado antibiótico, quando é inibido *in vitro* por uma concentração deste antibiótico que é associada a uma elevada possibilidade de sucesso terapêutico. A sensibilidade de uma estirpe bacteriana a determinado antibiótico é denominada por intermédia quando o microrganismo é inibido *in vitro* por uma concentração de antibiótico que está associada com um efeito terapêutico incerto. Um microrganismo é considerado resistente a determinado antibiótico quando é inibido *in vitro* por uma concentração da droga que está associada a elevadas possibilidades de fracasso

terapêutico. A multiresistência é definida pela resistência a três ou mais classes de antibióticos (Raghunath, D. 2008, Rodloff A. *et al.* 2008).

A maior parte dos antibióticos usados no tratamento de infecções podem ser divididos conforme o seu mecanismo de acção, tal como está descrito na Tabela 1 (Hancock R. E. 2007; Sousa, J. C. 2006).

Tabela 1: Principais grupos de antibióticos usados na terapêutica.

<u>Antibióticos antiparietais</u> (inibidores da síntese do peptidoglicano)	Fosfomicina D-cicloserina Bacitracina Vancomicina Teicoplanina β-lactâmicos
<u>Antibióticos antimembranares</u> (afectam a permeabilidade da membrana celular)	Polimixinas Tirotricina Gramicidina Daptomicina
Antibióticos inibidores da síntese proteica	Aminoglicosídeos Espectinomicina Tetraciclina Glicilciclina Cloranfenicol Macrólidos Lincosamidas Streptograminas Mupirocina Ácido Fusídico Oxazolidonas Cetolidos Evernimicina

Antibióticos inibidores da síntese dos ácidos nucleicos	Rifampicina Metronidazol Quinolonas
Antibióticos antimetabolitos	Sulfonamidas Trimetoprim PAS

#### 4. Mecanismos de resistência aos antibióticos

A batalha entre o Homem e os microrganismos que causam doença tem sido contínua ao longo dos tempos. A peste bubónica, tuberculose, malária, e, mais recentemente o vírus da imunodeficiência humana afectou porções substanciais da população humana causando morbilidade e mortalidade muito significativas. No início do século vinte, os avanços na investigação de drogas antibacterianas e a implementação de medidas de controlo de infecção mudou a maré a favor do Homem. De facto, a situação melhorou consideravelmente quando a penicilina ficou disponível no início dos anos quarenta. No entanto rapidamente, os microrganismos desenvolveram formas de resistência, e à medida que aumenta o uso de antibióticos mais complexos se tornam os mecanismos de resistência exibidos pelos microrganismos (Tenover, F. C. 2006).

Os microrganismos podem exhibir uma variedade de mecanismos contra os antibióticos, tais como: aquisição de genes que codificam enzimas, tais como  $\beta$ -lactamases, que destroem o antibiótico antes que ele tenha efeito; “expulsar” o antibiótico da célula bacteriana antes que ele atinja o seu alvo e exerça o seu efeito, através de bombas de efluxo; aquisição de genes que produzem uma parede celular alterada que já não contém o local de ligação do antibiótico ao microrganismo e aquisição de mutações que provocam uma baixa expressão dos genes que codificam porinas e assim limitam o acesso do antibiótico ao seu alvo intracelular. Por conseguinte, as populações de microrganismos podem tornar-se resistentes aos antibióticos através de mutações e processos selectivos ou por aquisição de material genético que codifica genes de resistência. As bactérias que adquirem mutações que conferem resistência são seleccionadas pelo uso de antibióticos, que mata as bactérias sensíveis mas permitem a sobrevivência das bactérias com mutações

que contêm os genes de resistência (pressão selectiva exercida pelo uso de antibióticos). Os processos de mutação e selecção juntamente com os mecanismos de aquisição de material genético, permitem que as bactérias se adaptem rapidamente à introdução de novos antibióticos no seu ambiente (Tenover, F. C. 2006).

Os elementos genéticos móveis são segmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) que codificam enzimas e outras proteínas que medeiam a movimentação de DNA dentro do genoma (movimentação intra-celular) ou entre células bacterianas (movimentação inter-celular). Esta última pode ser feita de três formas diferentes: transformação – o DNA livre de uma bactéria que é lisada é incorporado por uma segunda bactéria (receptora); conjugação – há contacto célula a célula, e o material genético é transferido através de pilis (estrutura proteica alongada que junta os dois microrganismos) e transdução: os genes que contêm a resistência são transferidos ente bactérias através de bacteriófagos (que funcionam como vectores) durante o processo de infecção celular. A Figura 2. ilustra os tipos de transferência genética entre bactérias.

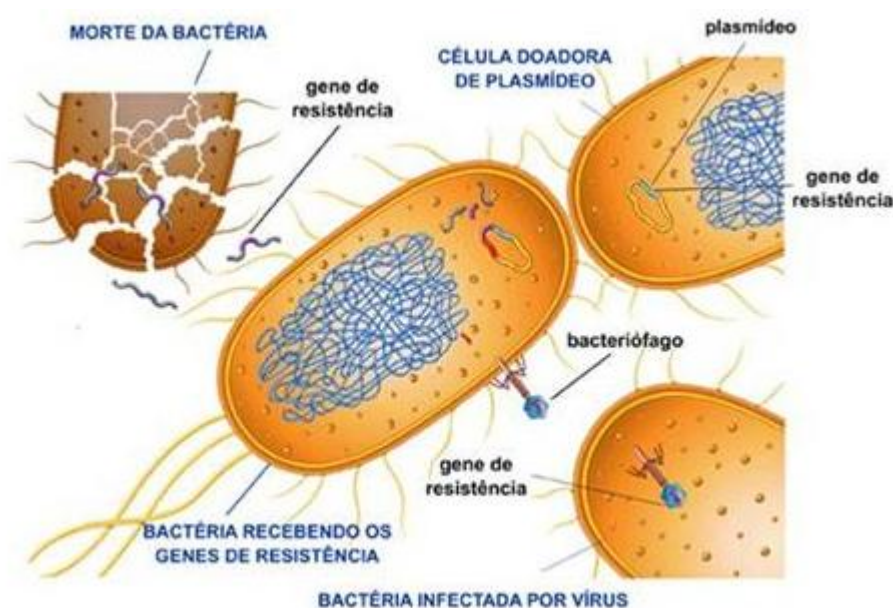


Figura 2: Tipos de transferência genética entre bactérias.

São exemplos de elementos genéticos móveis associados à resistência a antibióticos: plasmídeos (moléculas circulares de DNA de cadeia dupla, extracromossômicos e que possuem capacidade de replicação autónoma); sequências de

inserção (elementos genéticos mais simples, com cerca de 750 a 1500 pares de bases); transposões (constituídos por duas sequências de inserção que flanqueiam um ou mais genes que este transporta) e integrões (elementos genéticos capazes de capturar e expressar genes de resistência aos antibióticos) (Frost, L.S. 2005).

A resistência a um determinado microrganismo a um antibiótico pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca faz parte das características inatas, fenotípicas do microrganismo e é transmitida apenas verticalmente de geração em geração, constituindo parte da herança genética do microrganismo. O maior determinante de resistência intrínseca é a presença ou ausência do alvo de acção do antibiótico. A resistência adquirida deve-se ao aparecimento de resistência num microrganismo que anteriormente se mostrava sensível ao antibiótico em causa. Esta nova característica ganha pela bactéria é resultado de alterações estruturais e/ou bioquímicas da célula bacteriana, determinada por alterações genéticas, cromossómicas ou extra-cromossómicas, nomeadamente pela aquisição de plasmídeos, transposões, integrões, genes de resistências, entre outros. Através destes mecanismos de troca genética muitas podem tornar-se resistentes a várias classes de antibióticos e são estas bactérias multiresistentes que são a causa de maior preocupação, tanto a nível hospitalar como a nível comunitário (Livermore, D. M. 2003; Tenover, F. C. 2006).

## **5. Antibióticos antiparietais**

Os antibióticos antiparietais são inibidores da síntese do peptidoglicano e actuam nas diferentes fases da biosíntese deste composto. O alvo de acção destes antibióticos é, portanto, a parede celular das bactérias. A parede celular é responsável pela manutenção da forma da bactéria e sua integridade e é fundamental para a viabilidade celular (torna possível a sobrevivência das bactérias em ambientes hipotónicos). A estrutura da parede celular, quer nas bactérias Gram negativo ou Gram positivo, consiste em ligações “cross-linked” de um polímero, o peptidoglicano ou mucopeptídeo. Vários estudos demonstram a estreita relação que existe entre a síntese de peptidoglicano e o crescimento bacteriano e a própria forma da bactéria. O peptidoglicano é constituído por cadeias lineares de aminoácidos, N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), dispostos

alternadamente e unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ 1-4. Ao NAM estão ligados quatro aminoácidos. São estabelecidas pontes de união (“cross-link”) entre o terceiro aminoácido de uma cadeia peptídica e o quarto aminoácido da cadeia peptídica vizinha. O tipo de ponte varia com a espécie bacteriana (por exemplo em *S. aureus* essa ponte é pentaglicínica e em *E.coli* a ponte ocorre directamente entre dois aminoácidos). Embora a estrutura básica do peptidoglicano seja muito similar nas bactérias Gram positivo e nas Gram negativo, a espessura da camada de peptidoglicano é muito diferente: nas bactérias Gram positivo o peptidoglicano é um componente predominante (70%), sendo menos exuberante nas bactérias Gram negativo (1,5%). Nas bactérias Gram negativas o peptidoglicano é ligado covalentemente à membrana exterior através de uma lipoproteína. As bactérias Gram positivo, não têm membrana exterior, e a sua parede celular contém polímeros ligados covalentemente, tais como: ácido teicóico; ácido teicurónico e proteínas que se encontram ancoradas (covalentemente ou não) à parede celular (Heijenoort, J. 2001; Scheffers, D.J. et. al 2005).

As bactérias em divisão celular precisam de crescer para que ocorra a cisão binária. A biosíntese do peptidoglicano passa por três etapas fundamentais:

1. Fase citoplasmática – ocorre no citoplasma e caracteriza-se pela síntese dos precursores do NAG e NAM, respectivamente, UDP – NAG e UDP – NAM;
2. Fase membranar – tem lugar na membrana citoplasmática. Nesta etapa é sintetizado um lípido membranar intermediário, o bactoprenol, que transporta os precursores UDP – NAG e UDP – NAM através da membrana citoplasmática, formando o par NAG-NAM pentapeptídeo. O bactoprenol é muito útil nesta fase visto ser uma molécula lipofílica que permite o transporte dos precursores hidrofílicos, de um ambiente aquoso, como é o citoplasma, através da membrana citoplasmática hidrofóbica e até aos locais mais externos de incorporação do peptidoglicano;

3. Fase parietal – ocorre na parede externa da membrana citoplasmática e envolve a polimerização dos aminoaçúcares NAG e NAM e sua incorporação na parede celular já existente da bactéria em crescimento. Isto é conseguido através da acção das chamadas “proteínas receptoras de penicilina” (PBPs) que catalisam as reacções de transglicosilação e traspeptidação, responsáveis pela formação das ligações glicosídicas e peptídicas, respectivamente. As PBP's pertencem à família de acil-serinas transferases e incluem: as PBP's de alto peso molecular, as PBP's de baixo peso molecular e as  $\beta$ -lactamases. O número de PBP's e a natureza destas proteínas é específico da espécie e varia de espécie para espécie bacteriana.

Em suma, para crescer e para se dividir, a bactéria precisa não só de sintetizar novo peptidoglicano, mas também de quebrar as ligações covalentes que existem no peptidoglicano já formado, de maneira a permitir a inserção de novo peptidoglicano. Assim, a bactéria em crescimento, lisa a sua própria parede celular por acção das autolisinas endógenas (muramidases, glucosaminidases, amidases, endopeptidases e carboxipeptidases – dependendo da ligação específica de peptidoglicano que clivam) e os orifícios são colmatados com o peptidoglicano recém-sintetizado (Scheffers, D.J. et. al 2005).

### **5.1. Antibióticos $\beta$ -lactâmicos**

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, constituem o grupo de antibióticos mais importante dada a sua eficácia terapêutica e baixa toxicidade. É a classe mais variada e amplamente utilizada em todo o mundo. Esta classe de antibióticos actua na fase parietal da biosíntese do peptidoglicano. Apresentam, no entanto, alguns inconvenientes, como o facto de poderem ser inactivados por hidrolases bacterianas ( $\beta$ -lactamases). O grupo dos  $\beta$ -lactâmicos não é perfeitamente homogéneo na sua química, nem nos seus efeitos, nem sequer no seu manuseio terapêutico. Divide-se em seis grupos: penicilinas; cefalosporinas; monobactâmicos; carbapenemos; cefamicinas e inibidores de  $\beta$ -lactamases. No entanto, trata-se de um grupo que possui a característica comum de exibir um anel  $\beta$ -lactâmico constituído por três átomos de carbono e um de nitrogénio (azeto) com radicais



substituintes. O anel  $\beta$ -lactâmico encontra-se ligado a um anel de tiazolidina (Smet, A. *et al.* 2008).

### (I) Penicilinas

Em 1928, Alexandre Fleming descreve as propriedades líticas da penicilina, substâncias excretada pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, sobre culturas de *S.aureus*. Em 1940, Chain e Abraham isolam e purificam a penicilina e demonstram em animais, as propriedades antibacterianas deste antibiótico. A partir de culturas de fermentação do *Penicillium* foram isolados quatro tipos de compostos, designados, nos Estados Unidos, por penicilina F, G, X e K. A penicilina G (benzilpenicilina), cuja estrutura química é apresentada na Figura 3., revelou grande actividade contra bactérias Gram positivo e é considerado o progenitor das penicilinas actualmente em uso na terapêutica.

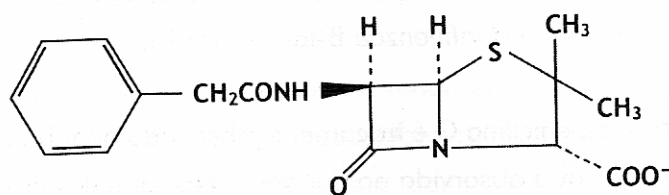


Figura 3: Estrutura química da penicilina G.

As penicilinas naturais são produzidas pela actividade fermentativa de estirpes mutantes de *Penicillium chrysogenum* e, de uma forma geral, têm actividade contra cocos Gram positivo, vários bacilos Gram positivo aeróbios e anaeróbios e apenas para alguns bacilos Gram negativo, não produtores de  $\beta$ -lactamases (Nicolaou, K. C. *et al* 2009).

Apesar da descoberta da penicilina ter modificado totalmente o panorama da terapêutica das doenças infecciosas, este antibiótico apresenta alguns pontos fracos: reduzido espectro de actividade; hidrólise pela acidez do estômago; rápida eliminação da corrente sanguínea por excreção urinária; susceptibilidade às  $\beta$ -lactamases e nalguns casos desencadeia fenómenos de hipersensibilidade.

A obtenção de novas moléculas inicia-se com a descoberta de uma molécula com melhores características – ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). A introdução de novas cadeias laterais na posição 6-amino tornou possível a proliferação de novas penicilinas, as penicilinas semisintéticas, com propriedades distintas da penicilina G. São exemplos de penicilinas semisintéticas: metecilina, nafcilina, isoazilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina, diclocaxilina e flucloxacilina), aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina e ciclacidina, entre outras) e as penicilinas antipseudomonas de espectro alargado (carbenicilina, ticarcilina, piperacilina, entre outras) (Rolinson G. N. 1998).

A metecilina não permeia facilmente a membrana exterior das bactérias Gram negativo, tendo fraca actividade contra estes microrganismos. A estrutura química da metecilina está ilustrada na Figura 4. São particularmente activas contra bactérias Gram positivo, incluindo as produtoras de  $\beta$ -lactamases. Tem utilização limitada, dados os seus efeitos secundários (aplasia medular, afectando a produção de neutrófilos) e as suas propriedades farmacocinéticas (instável nos ácidos, tendo que ser administrada parenteralmente). Deve ser usada apenas para o tratamento de infecções estafilocócicas resistentes à penicilina G. Com efeito, poucos anos após a utilização terapêutica da penicilina G, um número significativo de estirpes adquiriu resistência a este antibiótico. A resistência é devida à produção de uma penicilinase ( $\beta$ -lactamase) que é capaz de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico. Hoje em dia, mais de 90% das espécies de estafilococos produzem esta enzima. O gene que codifica a penicilinase é o *BlazA* e encontra-se num plasmídeo. As isoazilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina, diclocaxilina e flucloxacilina) e a metecilina resolveram o problema da resistência à benzilpenicilina pois eram refractárias às  $\beta$ -lactamases estafilocócicas. A metecilina foi introduzida na clínica na década de 50, aparecendo a primeira estirpe resistente à metecilina em 1961. As estirpes MRSA, frequentes a nível hospitalar, são resistentes a todos os  $\beta$ -lactâmicos pela aquisição de uma nova PBP, o PBP2a ou PBP2', com baixa afinidade para todos os  $\beta$ -lactâmicos. As estirpes MRSA revelam uma elevada resistência aos outros grupos de antibióticos, constituindo um problema de Saúde Pública. Os fármacos de eleição para as estirpes MRSA são vancomicina, teicoplanina e alguns novos antibióticos (quinupristina-dalfopristina, linezolidia) (Autiero I, *et al.* 2009; Schito G.C. 2006).

As estirpes MRSA possuem elementos genéticos móveis (cassetes cromossômicas) contendo o gene *mecA* que codifica a síntese de PBP2a. *S.aureus* tem quatro PBP's: PBP1, PBP2, PBP3 e PBP4. Enquanto que as estirpes *S.aureus* sensíveis à meticilina empregam estas quatro PBP's para catalizar as reacções de transpeptidação do peptidoglicano, nas estirpes MRSA a PBP2a faz a função destas quatro PBP's, quando estas são inactivadas pelos  $\beta$ -lactâmicos. Ou seja, a síntese de novas PBP's sem grande afinidade para os  $\beta$ -lactâmicos conferem às estirpes bacterianas resistência a estes antibióticos (Enright MC. 2003; Golemi-Kotra D *et al.* 2003).

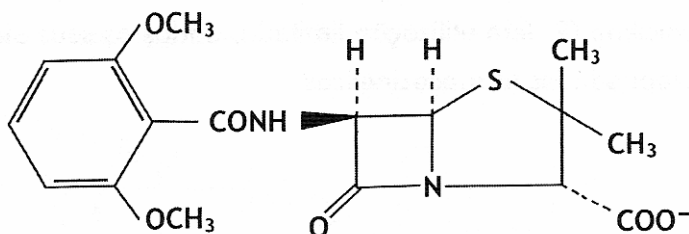


Figura 4: Estrutura química da meticilina.

Em 1961, alarga-se o espectro de actividade das penicilinas com acriação da aminopenicilina, a ampicilina. Esta nova penicilina e os seus derivados, amoxicilina, ésteres da ampicilina (bacampicilina, pivampicilina e talampicilina) e hetacilina são activos contra bacilos Gram negativo não produtores de  $\beta$ -lactamases mas têm uma actividade menor que a penicilina G contra bactérias Gram positivo. A estrutura química desta molécula está ilustrada na Figura 5. (Spengler, P. J. 1980).

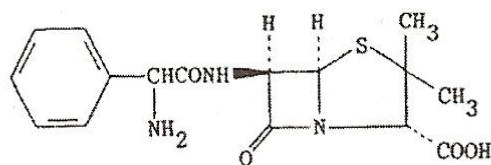


Figura 5: Estrutura química da ampicilina.

A associação de aminopenicilinas a compostos como o ácido clavulânico e sulbactam, conferes-lhe resistência às  $\beta$ -lactamases, ampliando assim o seu espectro de acção. Por exemplo, a combinação amoxicilina com o ácido clavulânico é usada nos protocolos de antibioterapia empírica de muitos hospitais, pois a sua actividade de largo espectro é particularmente activa contra bacilos Gram negativos e contra microrganismos anaeróbios (Rahnama'i, M. S. *et al*, 2009).

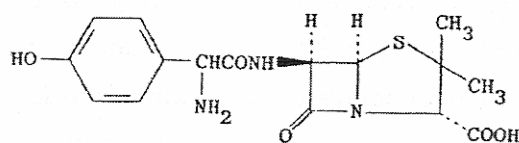
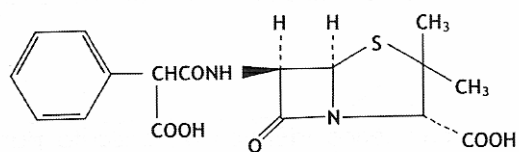
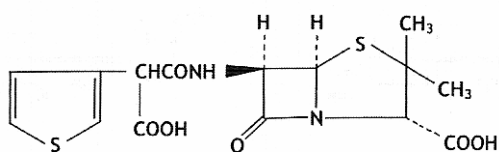


Figura 6: Estrutura química da amoxicilina.

As penicilinas antipseudomonas têm o seu espectro alargado devido a dois processos: introdução de um grupo carboxílico em posição alfa no radical R do núcleo da penicilina e pela introdução de um grupo acilamina ou ureído na cadeia lateral R. Como derivados alfacarboxílicos pode dar-se o exemplo da carbenicilina e a ticarcilina e entre as aciloaminopenicilinas ou ureidopenicilinas pode citar-se a piperacilina, azlocilina e mezlocilina. Tal como as penicilinas naturais e as aminopenicilinas, as alfacarboxipenicilinas e acilaminopenicilinas são inactivadas por determinadas  $\beta$ -lactamases dos bacilos Gram negativo. No entanto podem ser associados a outros compostos tornando-se resistentes às  $\beta$ -lactamases (como é o caso da ticarcilina quando associada ao ácido clavulânico e da piperacilina quando associada ao tazobactam) (Dundar D. *et al*. 2010, Joly-Guillou M.L. *et al*. 2010).

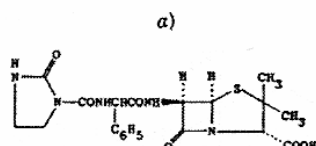


a)

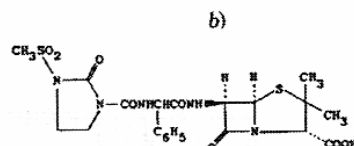


b)

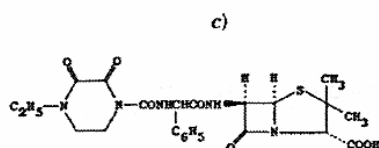
Figura 7: Estruturas químicas de derivados alfacarboxílicos das penicilinas antipseudomonas a) carbenicilina e b) ticarcilina.



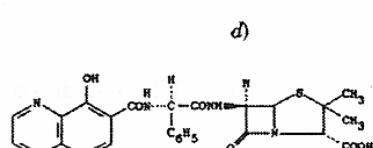
a)



b)



c)



d)

Figura 8: Estrutura química das aciloaminopenicilinas a) azlocilina, b) mezlocilina, c) piperacilina e d) apalcilina.

## (II) Cefalosporinas

Em 1945, Giuseppe Brotzu descreve as propriedades líticas da primeira cefalosporina, elaborada pelo fungo *Cephalosporium acremonium* – cefalosporina C. Este novo antibiótico apresenta um espectro de actividade mais vasto do que o revelado pela penicilina G, sendo activo contra as bactérias gram negativo e Gram positivo. Estruturalmente, a cefalosporina C é semelhante à penicilina G e a obtenção, em 1959, do ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), tornou possível uma grande proliferação de novos derivados semi-sintéticos, dado que é possível a modificação desta molécula em C3 e C7 na cadeia lateral de acilo. As variações são conseguidas através de substituições na cadeia lateral, sendo que substituições na posição 7 do anel  $\beta$ -lactâmico são responsáveis pela estabilidade pela estabilidade do antibiótico contra as  $\beta$ -lactamases, enquanto que as modificações na posição 3 do anel  $\beta$ -lactâmico provocam alterações nas propriedades farmacológicas e metabólicas das cefalosporinas (eliminação e tempo de semi-vida do antibiótico). A Figura 9. refere-se à estrutura básica das cefalosporinas e a Figura 10. mostra a estrutura química das 4 gerações de cefalosporinas.

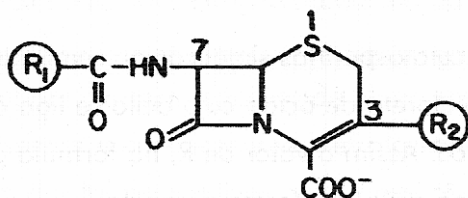


Figura 9: Estrutura básica das cefalosporinas.

As cefalosporinas são classificadas em quatro classes – 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações- de acordo com o seu espectro de actividade, tal como é descrito na Tabela 2. À medida que se avança nas diferentes gerações, o espectro alarga-se para Gram negativo (as cefalosporinas de 4<sup>a</sup> geração são as mais activas) mas perde-se alguma actividade para bactérias Gram positivo. As cefalosporinas de 1<sup>a</sup> geração são activas contra *S.aureus* sensíveis à meticilina (Barry, P. M. *et al.* 2009).

Tabela 2: Quadro resumo com os antibióticos pertencentes a cada uma das gerações de cefalosporinas.

Cefalosporinas	Antibióticos
1ª Geração	Cefalotina Cefaloridina Cefazolina Cefalexina Cefradina Cefadroxilo Cefatrizina
2ª Geração	Cefamandole Cefaclor Cefuroxima/Axetil – Cefuroxima Cefonicida Cefamicina (Cefotetan e Cefoxitina)
3ª Geração	Cefotaxima Ceftazidima Cefsulodina Cefoperazona Ceftriaxona Cefozidima Cefixima Ceftibuteno Cefprozil Cefetamet Pivoxil
4ª Geração	Cefepime Cefpiroma

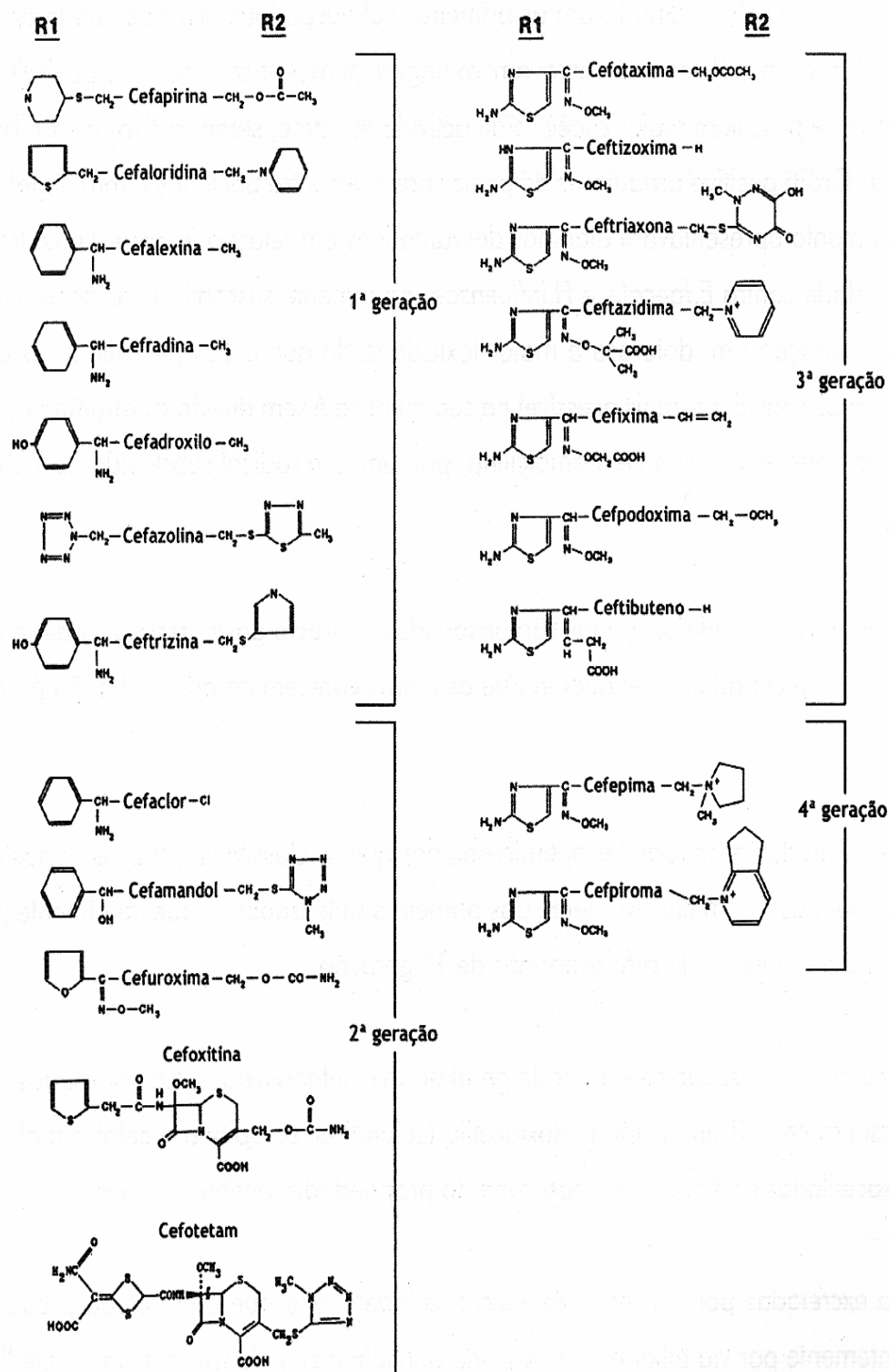


Figura 10: Estrutura química das cefalosporinas.



### (III) Monobactâmicos

São antibióticos monocíclicos, com grande estabilidade contra  $\beta$ -lactamases das bactérias Gram negativo. Os antibióticos naturais monobactâmicos são produzidos por: *Chromobacter spp.*, *Acetobacter spp.*, *Gluconobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Flexibacter spp.*. Estes antibióticos têm a particularidade de possuírem na sua molécula um grupo 2-oxoazetidina-1-sulfónico. O aztreonamo, cuja estrutura química está ilustrada na Figura 11, é a única molécula comercializada deste grupo. Apresenta grande analogia com a ceftazidima e é dotado de grande estabilidade para as  $\beta$ -lactamases TEM-1, TEM-2, SHV-1, PSE-1 e também contras as de *Bacillus fragilis*. É um fraco indutor das  $\beta$ -lactamases cromossómicas AmpC. É muito activo contra bacilos Gram negativo aeróbios, incluindo *Pseudomonas spp.* mas também tem actividade contra *E.coli* *Klebsiella spp.* e *Serratia spp.*. Sem actividade contra bactérias Gram positivo e anaeróbias estritas, estando indicado nas falhas terapêuticas com cefalosporinas de 3ª geração, para o tratamento de infecções por Gram negativo (Kapoor, S. *et al.* 2004).

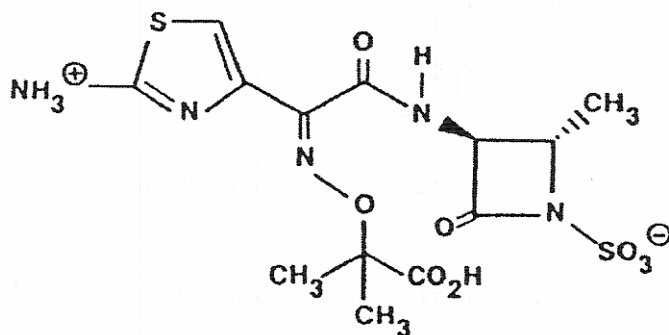


Figura 11: Estrutura química do aztreonamoo.

### (IV) Carbapenemos

Estes antibióticos constituem o grupo com mais actividade dentro dos  $\beta$ -lactâmicos. São antibióticos de largo espectro, pois as suas moléculas têm uma excelente penetração através dos canais de porina específicos, têm uma boa estabilidade às  $\beta$ -lactamases (resistem à hidrólise por  $\beta$ -lactamases da classe A, C e D de Ambler, incluindo as  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBL) e uma forte ligação a PBP's

essenciais. Dentro deste grupo de antibióticos há já disponíveis: imipenemo, meropenemo e ertapenemo. De um modo geral, estes antibióticos são de largo espectro, com actividade contra bactérias Gram positivo e Gram negativo aeróbias, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter*. À excepção do ertapenemo que tem fraca actividade contra estes microrganismos, pois trata-se de uma molécula aniónica que não penetra com tanta facilidade através da membrana exterior das bactérias Gram negativo, como acontece com os outros carbapenemos. São ineficazes contra estafilococos resistentes à meticilina e *Enterococcus faecium* mas dotados de grande resistência às  $\beta$ -lactamases plasmídicas ou cromossómicas. Somente as  $\beta$ -lactamases carbapenemases degradam os carbapenemos.

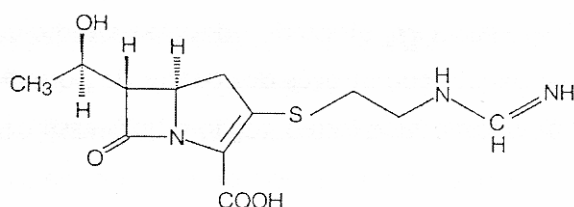


Figura 12: Estrutura química do imipenemo.

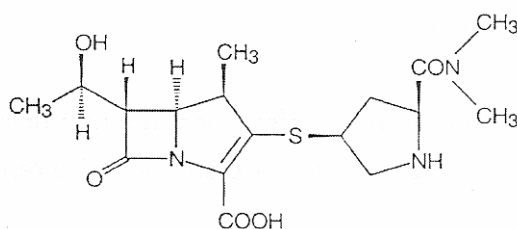


Figura 13: Estrutura química do meropenemo.

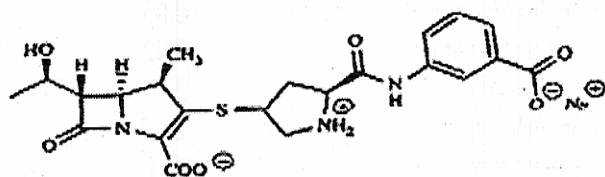


Figura 14: Estrutura química do ertapenemo.

O imipenemo deve ser utilizado apenas nos casos de infecções agudas graves, não devendo funcionar como antibiótico de primeira escolha no ambiente hospitalar. A frequência da sua utilização está a provocar um aumento da incidência de estirpes resistentes devido à disseminação de carbapenemases plasmídicas. O meropenemo é um antibiótico de reserva, que deve ser utilizado em situações clínicas graves, nas infecções por estirpes resistentes aos outros antibióticos, particularmente nas infecções por *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. O ertapenemo é usado clinicamente para as infecções graves da comunidade (onde estes microrganismos não são suspeitos), dado a sua menor actividade em ambiente hospitalar. Além disso, o uso criterioso e apropriado do ertapenem neste contexto pode ajudar a reduzir o desenvolvimento de resistências, devido a pressões selectivas, em *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Acinetobacter* (Brink, A. J. *et al.* 2004).

#### (V) Cefamicinas

As cefamicinas (cefoxitina e cefotetan) são fortemente aparentadas com as cefalosporinas, quer química quer farmacologicamente, sendo habitual inclui-las nas cefalosporinas.

#### (VI) Inibidores das $\beta$ -lactamases

Dentro deste grupo encontram-se: ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Apresentam uma estrutura bicíclica, o que pode ser observado na Figura 15.

O ácido clavulânico é um bom inibidor das  $\beta$ -lactamases estafilocócicas e das ESBL's. Não inibe as carbapenemases nem as TEM  $\beta$ -lactamases resistentes à inibição (IRT). Tem sido associado à amoxicilina e à ticarcilina ampliando-lhes o espectro.

O sulbactam inibe as  $\beta$ -lactamases da classe A. Tem sido associado à ampicilina e à cefoperazona (cefalosporina de 3ª geração)

O tazobactam inibe as  $\beta$ -lactamases da classe A, algumas da classe B e da classe C. Não inibe as  $\beta$ -lactamases AmpC nem as metalo  $\beta$ -lactamases. É associado à piperacilina, ampliando assim o seu espectro de acção (Nicolas-Chanoine 1997).

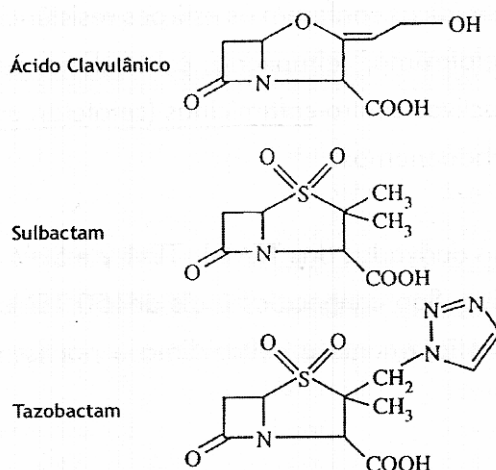


Figura15. Estrutura química dos inibidores das  $\beta$ -lactamases.

### 5.1.1 Mecanismo de acção dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

- Estes antibióticos actuam na fase parietal da biosíntese do peptidoglicano, inibindo irreversivelmente as enzimas D-D-carboxitranspeptidases colectivamente conhecidas como PBP's. O mecanismo de acção dos  $\beta$ -lactâmicos baseia-se na união destes antibióticos às PBP's, interrompendo o processo de transeptidação. Os antibióticos têm que atravessar a parede celular bacteriana e acilar as PBB's, o que requer a integridade do anel  $\beta$ -lactâmico. A permeação da parede celular nas bactérias Gram negativo e Gram positivo ocorre por mecanismos diferentes. A camada glicopeptídica das bactérias Gram positivo é espessa e externa a uma membrana celular única, logo é mais fácil a penetração dos  $\beta$ -lactâmicos nestas bactérias, nas bactérias Gram negativo a camada de peptidoglicano é muito mais fina e encontra-se entre a membrana plasmática e a membrana celular externa, o que poderá representar uma barreira de permeabilidade. No entanto, a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos tem um peso molecular e uma hidrofília compatível com a natureza

dos canais de porina, conseguindo por isso atingir o seu local de acção (Sousa, J. C. 2006).

### **5.1.2. Resistência aos $\beta$ -lactâmicos**

As bactérias escapam ao efeito bacteriolítico dos  $\beta$ -lactâmicos por quatro mecanismos:

2. Hidrólises enzimáticas dos  $\beta$ -lactâmicos por  $\beta$ -lactamases – as  $\beta$ -lactamases são enzimas plasmídicas ou cromossómicas que catalizam a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, inactivando o antibiótico. Estas enzimas são produzidas por bactérias Gram positivo para o meio ambiente e por bactérias Gram negativo ficando retidas no periplasma;
3. Modificação dos alvos (PBP's) – alterações genéticas poderão alterar a estrutura das PBP's diminuindo a afinidade de ligação dos antibióticos, o que se traduz numa diminuição da afinidade dos  $\beta$ -lactâmicos.
4. Impermeabilização da membrana externa – a natureza da molécula de antibiótico condiciona a permeabilidade do mesmo na membrana externa, através dos canais de porina. As porinas clássicas são trímeros estáveis que produzem grande permeabilidade a moléculas neutras, hidrofílicas e de baixo peso molecular. Além das porinas triméricas clássicas, existem também porinas monoméricas que permitem uma difusão lenta e não específica.
5. Bombas de efluxo – proteínas específicas que bombeiam o antibiótico para o exterior. Desta forma, não é atingida a concentração intracelular para inibir a síntese proteica (Sousa, J. C. 2006).

### 5.1.3. $\beta$ - lactamases

Tal como foi referido anteriormente, a produção de  $\beta$ - lactamases é o mecanismo de resistência mais comum e importante contra os antibióticos  $\beta$ - lactâmicos. Estas enzimas são capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ - lactâmico das penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactâmicos, tornando-os inactivos. Uma vez que estes antibióticos são preferencialmente incluídos nas terapias de várias doenças infecciosas, a presença e características destas enzimas desempenham um papel crucial na selecção da terapia mais adequada.

As classificações mais usadas são as de Ambler (classificação de acordo com a estrutura molecular nos Grupos A, B, C e D) e a de Bush, Jacoby e Medeiros (classificação que relaciona o perfil do substrato e dos inibidores das  $\beta$ - lactamases, com a sua estrutura molecular) (Bush, K. *et al.* 2010). Na Tabela 3. está descrita cada uma das classificações relacionando o perfil do substrato e dos inibidores das  $\beta$ - lactamases com a sua estrutura molecular.

Tabela 3. Classificação das  $\beta$ -lactamases relacionando o perfil do substrato e dos inibidores das  $\beta$ - lactamases com a sua estrutura molecular.

Classificação Bush-Jacoby (2009)	Classificação Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Classificação de Ambler	Substrato	Inibição pelo ácido clavulânico ou tazobactam	Enzimas
1	1	C	Cefalosporinas	Não	E. coli AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	-	C	Cefalosporinas	Não	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	Sim	PC1
2b	2b	A	Penicilinas e Cefalosporinas	Sim	TEM-1, TEM-2, SHV-1

2be	2be	A	Cefalosporinas de largo espectro e monobactâmicos	Sim	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	Não	TEM-30, SHV-10
2ber	-	A	Cefalosporinas de largo espectro e monobactâmicos	Não	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Sim	PSE-1, CARB-3
2ce	-	A	Carbenicilina, cefepime	Sim	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variável	OXA-1, OXA-10
2de	-	D	Cefalosporinas de largo espectro	Variável	OXA-11, OXA-15
2df	-	D	Carbapenemos	Variável	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de largo espectro	Sim	CepA
2f	2f	A	Carbapenemos	Variável	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B	Carbapenemos	Não	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B	Carbapenemos	Não	CphA, Sfh-1
-	4	Desconhecido			

Grupo 1, Cefalosporinas – neste grupo estão englobadas as cefalosporinas que pertencem ao grupo C de Ambler e são codificadas por cromossomas de várias *Enterobacteriaceae*. São mais activas nas cefalosporinas do que nas benzilpenicilinas. O novo subgrupo 1e apresenta um aumento de actividade contra a ceftazidima.

Grupo 2, Serina –  $\beta$ -lactamases – neste grupo estão incluídas as classes A e D de Ambler, representando o maior grupo de  $\beta$ -lactamases, devido ao aumento da descoberta de ESBL's nos últimos vinte anos.

Subgrupo 2a – maior capacidade de hidrolisar as benzilpenicilinas do que as cefalosporinas.

Subgrupo 2b – igual capacidade de hidrolisar benzilpenicilinas e cefalosporinas.

Subgrupos 2be – a este subgrupo pertencem as ESBL's. Têm elevada actividade contra cefotaxime, ceftazidima, cefepime e aztreonamo.

Subgrupo 2br – resistente ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.

Subgrupo ber - elevada actividade contra cefotaxime, ceftazidima, cefepime e aztreonamo associada à resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.

Subgrupo 2c – elevada capacidade de hidrolise da carbenicilina.

Subgrupo 2ce - elevada capacidade de hidrolise de carbenicilina, cefepime e cefpiroma.

Subgrupo 2d – elevada actividade contra cloxacilina e oxacilina.

Subgrupo 2de – hidrolizam cloxacilina e oxacilina e também tem actividade contra cefotaxime, ceftazidima, cefepime e aztreonamo.

Subgrupo 2df – hidrolizam cloxacilina e oxacilina e também carbapenemos.

Subgrupo 2e – hidrolizam as cefalosporinas e são inibidos pelo ácido clavulânico mas não pelo aztreonamoo.



Subgrupo f – elevada actividade contra carbapenemos, cefotaxime, ceftazidima, cefepime e aztreonamo.

Grupo 3, Metallo- $\beta$ -lactamases – engloba as metaloenzimas que são capazes de hidrolisar os carbapenemos e não são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Em vez disso são inibidas pelo ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA), um quelante de iões metálicos, usado para a inactivação de enzimas dependentes do zinco, como é o caso destas metallo- $\beta$ -lactamases. Pertencem à classe B de Ambler.

Subgrupo 3a - actividade de largo espectro, incluindo carbapenemos mas sem actividade contra monobactâmicos.

Subgrupo 3b – hidrolise preferencial de carbapenemos.

Grupo 4 – Este grupo já não é referido nas classificações mais recentes. Trata-se de um grupo pouco definido do ponto de vista molecular e compreende as penicilinas não inibidas pelo ácido clavulânico. Estas enzimas não são vulgarmente encontradas (Bush, K. *et al.* 2010).

## 5.2. Vancomicina

A vancomicina é um glicopeptídeo produzido por *Strptomyces orientalis*. É um bacteriolítico, activo contra bactérias em crescimento, inibidor da biosíntese de peptidoglicano na fase membranar. A vancomicina liga-se especificamente ao dipeptídeo D-alanil-Dalanina dos precursores NAG e NAM do peptidoglicano e este acontecimento provoca a lise da célula bacteriana em crescimento por acção das autolisinas endógenas. A vancomicina é dotada de fraca actividade contra bactérias Gram negativo, dado que a molécula do antibiótico com elevado peso molecular (1448 Daltons) não consegue atravessar os canais de porina da membrana externa. A vancomicina é activa contra *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* do grupo *viridans*, *Clostridium spp.*, *Lysteria monocytogenes*, *Actinomyces spp* e *Enterococcus spp* (Leung, S. S. F. *et al.* 2009). A estrutura química da vancomicina está ilustrada na Figura 16.

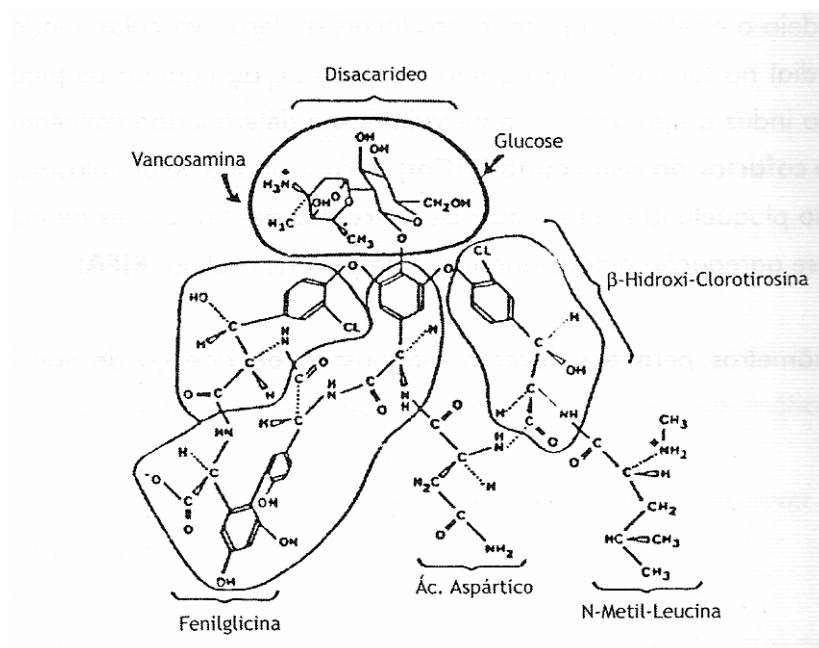


Figura 16. Estrutura química da vancomicina.

### 5.2.1 Enterococos resistentes à vancomicina

A emergência e disseminação da resistência à vancomicina nos humanos, pode ser atribuída ao largo uso deste antibiótico na prática clínica e ao uso do glicopéptido avoparcina na alimentação animal como factor promotor do crescimento (Smith, D.L. *et al.* 2005).

São conhecidos sete diferentes genótipos de resistência em enterococos que correspondem aos seguintes operões: vanA – muito frequente e que ocorre em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* e ocasionalmente em *Enterococcus avium*; vanB – é também muito frequente e ocorre quase exclusivamente em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*; vanC; vanD; vanE; vanG e vanL. De um modo geral, estes genes são responsáveis por: (I) síntese de um novo alvo (precursores do peptidoglicano que terminam em D-Ala-D-lactate [D-Ala-D-Lac] nos tipos vanA, vanB e vanD ou em D-Ala-D-serine [D-Ala-D-Ser] nos tipos vanC, vanE, vanG e vanL) que têm uma afinidade reduzida com a vancomicina e (II) eliminação da terminação normal D-alanil-Dalanina dos

precursores do peptidoglicano. O tipo de resistência associada ao gene *vanA* é o mais comum, estando associado a elevados níveis de resistência à vancomicina e é mediada pelo transposição Tn1546 (Périchon, B. *et al.* 2009).

### 5.2.2 VRSA/VISA

A vancomicina é um antibiótico muito usado no hospital para combater com eficácia as infecções estafilocócicas, dado o aumento da incidência de estirpes resistentes à meticilina (resistentes a todos os  $\beta$ -lactâmicos) e que também são resistentes à maioria dos outros grupos de antibióticos. Isto é, a vancomicina é o antibiótico de último recurso (e muitas vezes o único!) para tratar infecções por MRSA. A primeira estirpe de VRSA com MIC  $>32\mu\text{g/mL}$  foi referida no Michigan, Estados Unidos da América em 2002, com o gene *vanA*, que medeia a resistência à vancomicina em enterococos. A transferência conjugativa do gene *vanA* a partir de uma estirpe de enterococo resistente à vancomicina, explica a origem desta VRSA, conforme demonstrado laboratorialmente. Já em 1977 tinha sido descrita no Japão uma estirpe de *S.aureus* com resistência intermédia à vancomicina com MIC 8-16  $\mu\text{g/mL}$ . As estirpes têm aparecido em doentes com prolongada exposição à vancomicina. Dados laboratoriais indicam que são originárias de estirpes MRSA dadas as semelhanças observadas entre os perfis electroforéticos de fragmentos de DNA entre estirpes VISA e as estirpes MRSA previamente isolados do mesmo doente (Finks, J. *et al.* 2009).

As estirpes VISA têm a parede celular mais espessa, com um baixo teor de peptidoglicano, o que poderá contribuir para a sequestração das moléculas de vancomicina, reduzindo assim a susceptibilidade de *S.aureus* a este antibiótico. Sendo assim é de admitir que a vancomicina terá dificuldade em permear a parede celular, não atingindo o seu alvo (Enrigh, M. C. 2003).



## Objetivos



A resistência aos antibióticos é um problema grave a nível mundial e uma das maiores ameaças à saúde pública. Por um lado compromete o tratamento apropriado dos doentes infectados (eficácia do tratamento dos doentes reduzida e diminuição gradual das soluções terapêuticas) e por outro verifica-se o aumento dos custos associados aos cuidados de saúde (internamentos mais longos com recurso a vários exames complementares de diagnóstico). Por seu lado, há que ter em conta o preocupante aumento da morbilidade e mortalidade associada a este problema.

#### Objectivos:

- Identificar os microrganismos mais comuns causadores de infecção em doentes oncológicos em regime de internamento hospitalar;
- Relacionar as diferentes variáveis - sexo, idade, serviço de internamento, local da infecção - com o tipo de microrganismo;
- Identificar os perfis de resistência a antibióticos dos microrganismos isolados.





## **Material e Métodos**



## **1. Caracterização da população estudada**

O Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. (IPOCFG, E.P.E.) é uma unidade hospitalar que integra a rede de prestação de cuidados de saúde do Serviço Nacional de Saúde, desempenhando um importante papel no diagnóstico e tratamento da doença oncológica em toda a Região Centro, com uma população estimada de dois milhões e meio de habitantes. Os serviços de internamento deste hospital podem ser separados em internamentos de especialidades médicas (Oncologia Médica, Radioterapia e Cuidados Paliativos) e especialidades cirúrgicas (Cirurgia; Cirurgia Cabeça e Pescoço; Ginecologia e Unidade de Cuidados Intermédios).

A população em estudo é constituída por doentes oncológicos apenas em regime de internamento. Foram estudados 106 doentes, com culturas microbiológicas positivas, durante o período de Setembro de 2009 a Fevereiro de 2010, sendo 63 homens e 43 mulheres com uma média de idades de 62,9 anos.

No total foram isolados 187 microrganismos. É importante referir que durante o período do estudo verificaram-se casos de doentes que foram internados mais do que uma vez e também casos de envio de mais do que uma amostra biológica do mesmo doente para o laboratório durante o seu período de internamento. Para a contabilização do número de isolados microbiológicos utilizou-se o seguinte critério: nos casos de amostras do mesmo produto biológico do mesmo doente serem recebidos no período de uma semana, para efeitos estatísticos, são ignorados os resultados duplicados e só se considera um resultado para as várias amostras (ou seja apenas é contabilizado um isolado microbiológico).

A informação recolhida de cada uma das espécies isoladas incluiu: data; local da infecção/tipo de amostra biológica; características do doente (sexo e idade); proveniência (enfermaria onde o doente estava internado) e o perfil de resistência aos antibióticos.

## 2. Identificação dos microrganismos

Os produtos biológicos recebidos no laboratório (sangue; urina; exsudato; fezes; exsudato genital e secreções respiratórias) foram semeados nos meios de cultura e condições de incubação apropriados, de acordo com o que está descrito na Tabela 4. De seguida identificaram-se e realizaram-se os antibiogramas dos microrganismos isolados de interesse clínico.

Tabela 4: Meios de cultura, condições de incubação e necessidade de realização da coloração de Gram e exame directo (sem coloração) dos produtos biológicos dos quais foram isolados os microrganismos estudados.

<b>Produto Biológico</b>	<b>Meios de Cultura</b>	<b>Incubação</b>	<b>Gram Exame Directo</b>
Sangue	Frascos para cultura de microrganismos aeróbios; anaeróbios e fungos	Incubação no Bactec 9050	Não Não
Urina	CLED, CNA	18 a 24horas a 37 °C	Não Não
Exsudato	Columbia, PVX, Sab e caldo de Schaedler	24horas a 37 °C em aerobiose	Sim Não
Fezes	Gelose de Hektoen Caldo de Selenite Gelose de Campy	24horas a 37 °C em aerobiose 48horas a 42 °C em microaerofilia	Não Não
Exsudato genital	Columbia, PVX e Sab	24horas a 37 °C em aerobiose	Sim Sim
Secreções respiratórias	Columbia, PVX e Sab	24horas a 37 °C em aerobiose	Sim Não

CLED – gelose de cistina lactose deficiente em electrólitos; Columbia - Gelose com 5% de sangue de carneiro; PVX - gelose de chocolate com suplemento polivitex; Sab - gelose de

Sabouraud com cloranfenicol; CNA - gelose com 5% de sangue de carneiro, ácido nalidíxico e colistina.

Nota: No caso dos exsudatos, quando a colheita/transporte se tenha realizado em condições de anaerobiose, são semeadas duas geloses de Columbia, uma é incubada 24 horas a 37 °C em aerobiose e a outra é incubada 48 horas a 37 °C em anerobiose.

A identificação dos microrganismos e o respectivo teste de susceptibilidade aos antibióticos foram feitos no sistema VITEK2 da bioMérieux.

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes cartas de identificação: GP, para identificar microrganismos Gram positivo; GN, para identificar bacilos Gram negativo fermentadores e não fermentadores e YST, para identificar leveduras.

O procedimento para a preparação destas 3 cartas de identificação é basicamente o mesmo:

- Transfere-se assepticamente 3,0 mL de solução salina estéril (NaCl 0,45% a 0,50% e pH 4,5 a 7,0) para um tubo de ensaio de plástico transparente;
- Com a ajuda de uma ansa estéril transfere-se uma quantidade adequada de colónias morfológicamente idênticas para o tubo com a solução salina;
- Prepara-se a suspensão homogênea do microrganismo com uma densidade adequada segundo o padrão McFarland (0,50 a 0,63 para as cartas GP e GN e 1,80 a 2,20 para as cartas YST), usando o calibrador do DensiCHEK do Vitek 2;
- Coloca-se o tubo da suspensão e a respectiva carta na cassette;
- A cassette é finalmente introduzida no aparelho, local onde se processam as etapas de enchimento, selagem e incubação.

As cartas GP, GN e YST baseiam-se em métodos bioquímicos estabelecidos e em substratos recentemente desenvolvidos. As cartas GP e GN contêm 43 e 47 testes bioquímicos, respectivamente, que medem a utilização da fonte de carbono, a resistência e a actividade enzimática. Os resultados finais estão disponíveis em aproximadamente 8 e 10 horas, respectivamente. A carta YST possui 46 testes bioquímicos que medem a utilização da fonte de carbono, a utilização da fonte de nitrogénio e a actividade enzimática. Os resultados estão disponíveis em aproximadamente 18 horas. O conteúdo de cada uma das cartas supra-referidas está descrito nas tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5: Conteúdo dos poços das cartas GP.

Poço	Teste	Mnemónica	Quantidade/Poço
2	D-AMIGDALINA	AMY	0,1875 mg
4	FOSFATIDILINOSITOL FOSFOLIPASE C	PIPLC	0,015 mg
5	D-XILOSE	dXYL	0,3 mg
8	ARGININA DIHIDROLASE 1	ADH1	0,111 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0,036 mg
11	ALFA-GLUCOSIDASE	AGLU	0,036 mg
13	Ala-Fe-Pro ARILAMIDASE	APPA	0,0384 mg
14	CICLODEXTRINA	CDEX	0,3 mg
15	L-Aspartato ARILAMIDASE	AspA	0,024 mg
16	BETA GALACTOPIRANOSIDASE	BGAR	0,00204 mg
17	ALFA-MANOSIDASE	AMAN	0,036 mg
19	FOSFATASE	PHOS	0,0504 mg
20	Leucina ARILAMIDASE	LeuA	0,0234 mg
23	L-Prolina ARILAMIDASE	ProA	0,0234 mg
24	BETA-GLUCURONIDASE	BGURr	0,0018 mg
25	ALFA-GALACTOSIDASE	AGAL	0,036 mg
26	L-Pirrolidonil - ARILAMIDASE	PyrA	0,018 mg
27	BETA-GLUCURONIDASE	BGUR	0,0378 mg
28	Alanina ARILAMIDASE	AlaA	0,0216 mg
29	Tirosina ARILAMIDASE	TyrA	0,0276 mg
30	D-SORBITOL	dSOR	0,1875 mg
31	UREASE	URE	0,15 mg
32	RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B	POLYB	0,00093 mg
37	D-GALACTOSE	dGAL	0,3 mg
38	D-RIBOSE	dRIB	0,3 mg
39	Alcalinização L-LACTATO	ILATk	0,15 mg
42	LACTOSE	LAC	0,96 mg
44	N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA	NAG	0,3 mg
45	D-MALTOSE	dMAL	0,3 mg
46	RESISTÊNCIA À BACITRACINA	BACI	0,0006 mg
47	RESISTÊNCIA À NOVOBIOCINA	NOVO	0,000075 mg
50	CRESCIMENTO EM NaCl 6,5%	NC6.5	1,68 mg
52	D-MANITOL	dMAN	0,1875 mg
53	D-MANOSE	dMNE	0,3 mg
54	METIL-B-D-GLUCOPIRANOSÍDEO	MBdG	0,3 mg
56	PULULANO	PUL	0,3 mg
57	D-RAFINOSE	dRAF	0,3 mg
58	RESISTÊNCIA O/129 (comp.vibrio.)	O129R	0,0084 mg
59	SALICINA	SAL	0,3 mg
60	SACAROSE/SUCROSE	SAC	0,3 mg
62	D-TREALOSE	dTRE	0,3 mg
63	ARGININA DIHIDROLASE 2	ADH2s	0,27 mg
64	RESISTÊNCIA À OPTOQUINA	OPTO	0,000399 mg

Tabela 6: Conteúdo dos poços das cartas GN.

Poço	Teste	Mnemónica	Quantidade/ Poço
2	Ala-Fe-Pro-ARILAMIDASE	APPA	0,0384 mg
3	ADONITOL	ADO	0,1875 mg
4	L-Pirrolidonil - ARILAMIDASE	PyrA	0,018 mg
5	L-ARABITOL	IARL	0,3 mg
7	D-CELOBIOSE	dCEL	0,3 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0,036 mg
10	PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> S	H <sub>2</sub> S	0,0024 mg
11	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0,0408 mg
12	Glutamil Arilamidase pNA	AGLTp	0,0324 mg
13	D-GLUCOSE	dGLU	0,3 mg
14	GAMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE	GGT	0,0228 mg
15	FERMENTAÇÃO/GLUCOSE	OFF	0,45 mg
17	BETA-GLUCOSIDASE	BGLU	0,036 mg
18	D-MALTOSE	dMAL	0,3 mg
19	D-MANITOL	dMAN	0,1875 mg
20	D-MANOSE	dMNE	0,3 mg
21	BETA-XILOSIDASE	BXYL	0,0324 mg
22	BETA-Alanina arilamidase pNA	BAlap	0,0174 mg
23	L-Prolina ARILAMIDASE	ProA	0,0234 mg
26	LIPASE	LIP	0,0192 mg
27	PALATINOSE	PLE	0,3 mg
29	Tirosina ARILAMIDASE	TyrA	0,0276 mg
31	UREASE	URE	0,15 mg
32	D-SORBITOL	dSOR	0,1875 mg
33	SACAROSE/SUCROSE	SAC	0,3 mg
34	D-TAGATOSE	dTAG	0,3 mg
35	D-TREALOSE	dTRE	0,3 mg
36	CITRATO (SÓDIO)	CIT	0,054 mg
37	MALONATO	MNT	0,15 mg
39	5-QUETO-D-GLUCONATO	5KG	0,3 mg
40	Alcalinização L-LACTATO	ILATk	0,15 mg
41	ALFA-GLUCOSIDASE	AGLU	0,036 mg
42	Alcalinização SUCINATO	SUCT	0,15 mg
43	Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASE	NAGA	0,0306 mg
44	ALFA-GALACTOSIDASE	AGAL	0,036 mg
45	FOSFATASE	PHOS	0,0504 mg
46	Assimilação Glicina ARILAMIDASE	GlyA	0,012 mg
47	ORNITINA DESCARBOXILASE	ODC	0,3 mg
48	LISINA DESCARBOXILASE	LDC	0,15 mg
52	BASE DESCARBOXILASE	ODEC	NA
53	Assimilação L-HISTIDINA	IHI Sa	0,087 mg
56	CUMARATO	CMT	0,126 mg
57	BETA-GLUCORONIDASE	BGUR	0,0378 mg
58	RESISTÊNCIA O/129 (comp.vibrio.)	O129R	0,0105 mg
59	Glu-Gli-Arg-ARILAMIDASE	GGAA	0,0576 mg
61	Assimilação L-MALATO	IMLTa	0,042 mg
62	ELLMAN	ELLM	0,03 mg
64	Assimilação L-LACTATO	ILATa	0,186 mg

Tabela 7: Conteúdo dos poços das cartas YST.



Poço	Teste	Mnemónica	Quantidade/Poço
3	L-Lisina ARILAMIDASE	LysA	0,0228 mg
4	Assimilação L-MALATO	IMLTa	0,15 mg
5	Leucina -ARILAMIDASE	LeuA	0,0234 mg
7	ARGININA GP	ARG	0,15 mg
10	Assimilação ERITRITOL	ERYa	0,3 mg
12	Assimilação GLICEROL	GLYLa	0,16 µL
13	Tirosina ARILAMIDASE	TyrA	0,0276 mg
14	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0,0408 mg
15	Assimilação ARBUTINA	ARBa	0,3 mg
18	Assimilação AMIGDALINA	AMYa	0,3 mg
19	Assimilação D-GALACTOSE	dGALa	0,3 mg
20	Assimilação GENTIOBIOSE	GENa	0,3 mg
21	Assimilação D-GLUCOSE	dGLUa	0,3 mg
23	Assimilação LACTOSE	LACa	0,96 mg
24	Assimilação METIL-A-D-GLUCOPIRANOSÍDEO	MAdGa	0,3 mg
26	Assimilação D-CELOBIOSE	dCELa	0,3 mg
27	GAMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE	GGT	0,0228 mg
28	Assimilação D-MALTOSE	dMALa	0,3 mg
29	Assimilação D-RAFINOSE	dRAFa	0,3 mg
30	PNP-N-acetil-BD-galactosaminidase 1	NAGA1	0,0306 mg
32	Assimilação D-MANOSE	dMNEa	0,3 mg
33	Assimilação D-MELIBIOSE	dMELa	0,3 mg
34	Assimilação D-MELEZITOSE	dMLZa	0,3 mg
38	Assimilação L-SORBOSE	ISBEa	0,3 mg
39	Assimilação L-RAMNOSE	IRHAa	0,3 mg
40	Assimilação XILITOL	XLTa	0,3 mg
42	Assimilação D-SORBITOL	dSORa	0,1875 mg
44	Assimilação SACAROSE/SUCROSE	SACa	0,3 mg
45	UREASE	URE	0,15 mg
46	ALFA-GLUCOSIDASE	AGLU	0,036 mg
47	Assimilação D-TURANOSE	dTURa	0,3 mg
48	Assimilação D-TREALOSE	dTREa	0,3 mg
49	Assimilação NITRATO	NO3a	0,03 mg
51	Assimilação L-ARABINOSE	IARaA	0,3 mg
52	Assimilação D-GALACTURONATO	dGATa	0,15 mg
53	Hidrólise ESCULINA	ESC	0,225 mg
54	Assimilação L-GLUTAMATO	IGLTa	0,15 mg
55	Assimilação D-XILOSE	dXYLa	0,3 mg
56	Assimilação DL-LACTATO	LATa	0,15 mg
58	Assimilação ACETATO	ACEa	0,15 mg
59	Assimilação CITRATO (SÓDIO)	CITa	0,15 mg
60	ASSIMILAÇÃO GLUCURONATO	GRTas	0,15 mg
61	Assimilação L-PROLINA	IPROa	0,15 mg
62	Assimilação 2-QUETO-D-GLUCONATO	2KGa	0,15 mg
63	Assimilação N-ACETIL-GLUCOSAMINA	NAGa	0,15 mg
64	Assimilação D-GLUCONATO	dGNTa	0,15 mg

O sistema VITEK2 da bioMérieux identifica um microrganismo com uma metodologia baseada nas características dos dados e no conhecimento sobre o microrganismo e as reacções analisadas. Foram recolhidos dados suficientes de estirpes conhecidas para se estimarem as reacções típicas das espécies em questão num conjunto de compostos bioquímicos de diferenciação. Se não for reconhecido um padrão único de identificação, é fornecida uma lista de possíveis microrganismos ou a estirpe é determinada como estando fora da capacidade da base de dados. Como parte do processo de identificação, o software compara o conjunto de reacções do teste com o conjunto de reacções esperadas para cada microrganismo, ou grupo de microrganismos. Um valor quantitativo – a percentagem de probabilidade - é calculado e refere-se a como as reacções observadas se comparam com as reacções típicas de cada microrganismo, sendo que uma correspondência perfeita entre o padrão de reacção do teste e o padrão de reacção característico de um determinado microrganismo, ou grupo de microrganismos, daria uma percentagem de probabilidade de 99. O intervalo de percentagem de probabilidades no caso de escolha única é de 85 a 99.

### **3. Testes de sensibilidade aos antibióticos**

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer microrganismo que contribua para um processo infeccioso que justifique uma terapia antimicrobiana. As colónias de cada tipo de microrganismo que possa desempenhar um papel patogénico são seleccionados da placa de gelose e testadas quanto à sensibilidade. Estes testes são então examinados e a MIC é determinada. A MIC obtida com um teste de diluição pode indicar ao clínico a concentração de antibiótico necessária no local de infecção para inibir o microrganismo infeccioso.

As MIC são determinadas usando concentrações de antibiótico derivadas de diluições duplas sucessivas, sendo a MIC determinada a partir da concentração mais baixa em que ocorre a inibição do crescimento. Um critério de interpretação (sensível, intermédio ou resistente) pode então ser atribuído a um resultado da MIC, de forma a ajudar na orientação terapêutica. Cada carta de antibiograma apresenta 64 micropoços. Em cada uma delas existe um poço de controlo, que contém apenas meio de cultura microbiológico, contendo

os restantes poços quantidades conhecidas de um antibiótico específico combinado com um meio de cultura.

A suspensão de microrganismo a ser testada deve ser diluída numa concentração padronizada em 0.45% de solução salina antes de ser utilizada para hidratar o meio antibiótico na carta. A carta é em seguida cheia, selada e colocada no leitor/incubador do aparelho. O aparelho monitoriza o crescimento em cada um dos poços da carta durante um período de tempo definido (até 18 horas para bactérias ou até 36 horas para leveduras). No fim do ciclo de incubação, os valores de MIC são determinados para cada antibiótico contido na carta.

As cartas de sensibilidade que se utilizaram neste trabalho e os respectivos antibióticos que cada uma testa foram os seguintes:

- AST-P580 (determinação da sensibilidade de *Staphylococcus spp.*): Benzilpenicilina, Clindamicina, Eritromicina, Fosfomicina, Gentamicina, Levofloxacina, Linezolid, Moxifloxacina, Mupirocina, Nitrofurantoína, Oxacilina CMI, Rifampicina, Teicoplanina, Teste de screening de cefoxitina, Tetraciclina, Tigeciclina, Tobramicina, Trimetoprim/Sulfametoxazol, Vancomicina e Ácido fusídico.

- AST-P586 (determinação da sensibilidade de *Enterococcus spp.*): Ampicilina, Ampicilina/sulbactam, Benzilpenicilina, Cefuroxima, Cefuroxima Axetil, Clindamicina, Eritromicina, Imipenemo, Levofloxacina, Linezolid, Nitrofurantoína, Quinupristina/Dalfopristin, Teicoplanina, Tetraciclina, Tigeciclina e Vancomicina.

- AST-N151 (determinação da sensibilidade de bacilos Gram negativo): Amicacina, Amoxicilina + ácido clavulânico, Ampicilina, Cefalotina, Cefepima, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefuroxima, Cefuroxima Axetil, Ciprofloxacina, Gentamicina, Levofloxacina, Meropenemo, Nitrofurantoína, Norfloxacina, Piperacilina/Tazobactam, Tetraciclina, Tobramicina e Trimetoprim/Sulfametoxazol.

- AST-N093 (determinação da sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa*): Amicacina, Aztreonamo, Cefepima, Cefpiroma, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Colistina, Gentamicina, Imipenemo, Isepamicina, Meropenemo, Netilmicina, Peploxacina, Piperacilina, Piperacilina/Tazobactam, Ticarcilina, Ticarcilina/Ácido Clavulânico, Tobramicina e Trimetoprim/Sulfametoxazol.

- YSO1 (determinação da sensibilidade de leveduras): Anfotericina B, Fluconazol, Fluocitosina e Voriconazol.

Nas espécies de *E.coli* e *Klebsiella* spp. é realizado um teste no VITEK2 da bioMérieux que detectada a produção de ESBL. Trata-se de um teste de confirmação para as  $\beta$ -lactamases de largo espectro que são inibidas pelo ácido clavulânico, e que utiliza cefotaxima, ceftazidima e cefepima, com e sem ácido clavulânico, na determinação de um resultado positivo ou negativo. Para todas as estirpes produtoras de  $\beta$ -lactamases de largo espectro confirmadas por este teste, a interpretação deverá ser assinalada como espécie resistente a todas as penicilinas, cefalosporinas e aztreonamo.

Nos isolados de *S.aureus* é realizado um teste no VITEK2 da bioMérieux que detectada as espécies MRSA. A resistência à oxacilina é utilizada para detectar a presença de estirpes MRSA. O teste “Oxacilina CMI” e o teste de screening de cefoxitina são usados em conjunto para determinar a interpretação final para a oxacilina. O primeiro teste fornece uma determinação da MIC e uma interpretação da categoria para a oxacilina (resistente ou sensível). Os resultados deste teste estão relacionados com os resultados que seriam obtidos a partir do teste de diluição padrão da oxacilina. A faixa de denominação é de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  a 8,0  $\mu\text{g/mL}$ . O segundo teste é utilizado para prever a resistência à oxacilina mediada pelo gene *mecA* e baseia-se no teste de cefoxitina em disco.

## **Resultados e Discussão**



## 1.Microrganismos isolados

Dos 187 microrganismos isolados, de doentes oncológicos internados, os mais frequentemente encontrados foram: *E.coli*; *Staphylococcus* coagulase negativo; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; *Candida spp.*; *Enterococcus faecalis*; *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. A tabela que se segue descreve o número total de cada uma das espécies isolados neste estudo.

Tabela 8: Espécies isoladas e a sua prevalência durante o período de Setembro de 2009 a Fevereiro de 2010.

<i>Escherichia coli</i>	30	16,0%
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	25	13,4%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	12,8%
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	12,8%
<i>Candida spp.</i>	17	9,1%
<i>Enterococcus faecalis</i>	17	9,1%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	7,0%
<i>Proteus mirabilis</i>	11	5,9%
<i>Enterococcus faecium</i>	4	2,1%
<i>Streptococcus spp.</i>	3	1,6%
<i>Serratia marcescens</i>	3	1,6%
<i>Corynebacterium sp.</i>	3	1,6%
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1,1%
<i>Morganella morganii</i>	2	1,1%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	1,1%
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	1,1%
<i>Enterobacter asburiae</i>	1	0,5%
<i>Bacillus cereus</i>	1	0,5%
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1	0,5%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,5%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,5%
TOTAL	187	100%

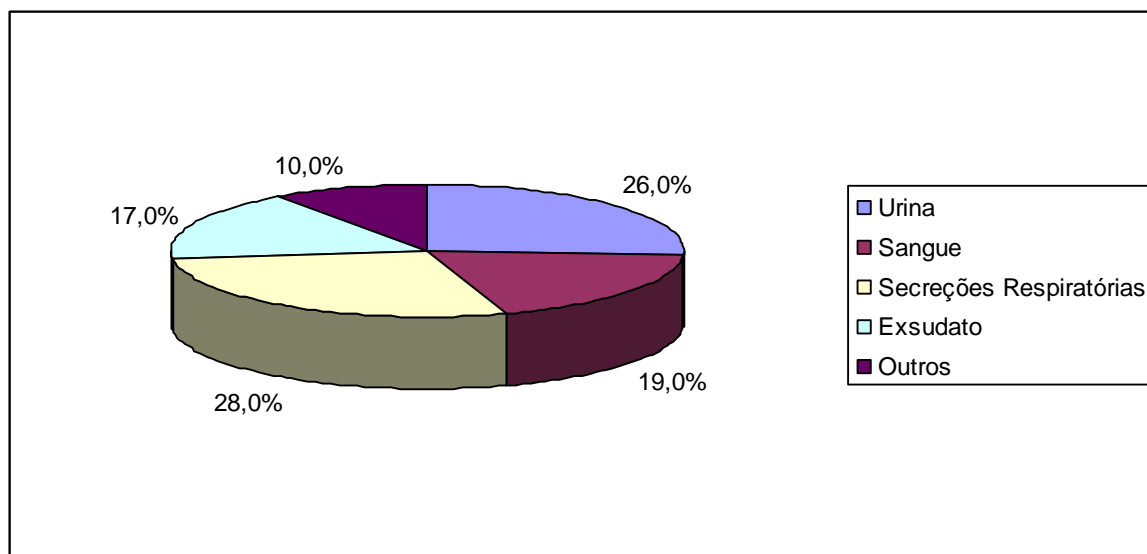


Figura 17: Distribuição dos 187 microrganismos isolados de acordo com o produto biológico de onde foram recolhidos: urina; sangue; secreções respiratórias; exsudato e outros.

Como se pode constatar, na Figura 17, as infecções mais prevalentes neste estudo foram as infecções respiratórias ( $n = 51 - 28\%$ ) e infecções urinárias ( $n = 49 - 26\%$ ). Foram isolados 36 microrganismos (19%) no sangue e 32 microrganismos de exsudato (17%). Os restantes 19 microrganismos isolados referem-se às espécies que foram isoladas de ponta de catéter, líquido peritoneal e fezes.

Os resultados encontrados estão de acordo com o que é descrito na literatura.

Sabendo que no período do estudo se registaram 3212 internamentos, pode dizer-se que o facto de se ter isolado 187 microrganismos em 106 doentes estudados não é um dado alarmante, mesmo tendo em conta de que se tratam de doentes oncológicos com maior susceptibilidade para a infecção. Neste estudo a percentagem de infecção foi de cerca de 3,3%.



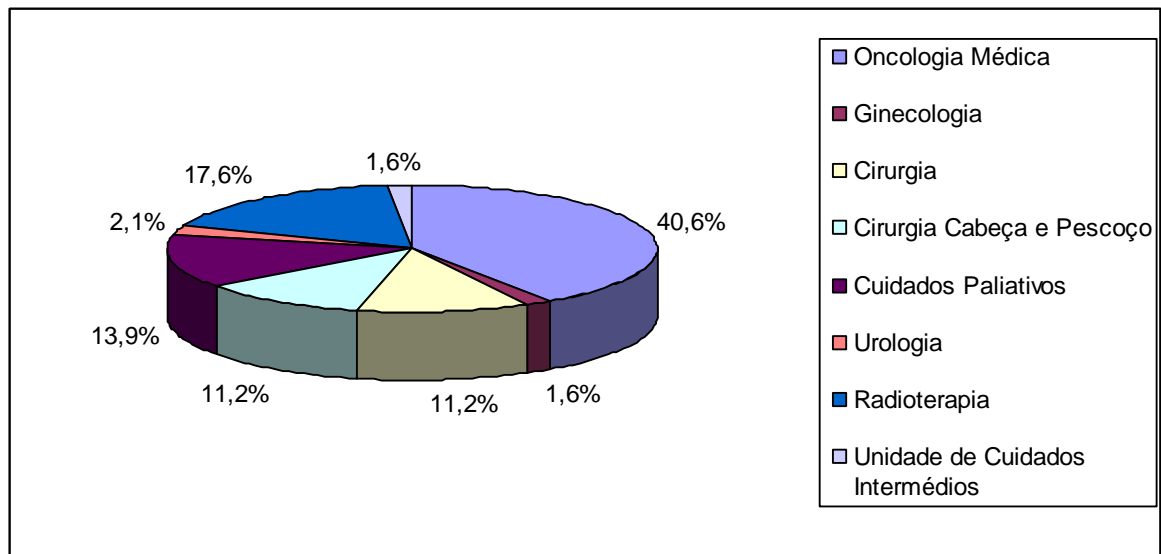


Figura 18: Distribuição dos 187 microrganismos isolados de acordo com o serviço em que foram isolados: Oncologia Médica; Ginecologia; Cirurgia; Cirurgia Cabeça e Pescoço; Cuidados Paliativos; Urologia; Radioterapia e Unidade de Cuidados Intermédios.

Tal como se pode observar na Figura 18, o serviço onde foi detectada a maior taxa de infecção foi na Oncologia Médica, que se destacou dos restantes com cerca de 40,6% (n = 76). Os serviços de Radioterapia, Cuidados Paliativos, Cirurgia Cabeça e Pescoço, Cirurgia e apresentaram taxas de infecção de 17,6% (n = 33); 13,9% (n = 26); 11,2% (n = 21) e 11,2 (n = 21), respectivamente. Os serviços onde a taxa de infecção foi menor foram o de Urologia (n = 4 – 2,1%) e os de Ginecologia e Unidade de Cuidados Intermédios, ambos com 1,6% (n = 3).

Está descrito na literatura que as maiores taxas de infecção se verificam nas unidades de cuidados intensivos, nas unidades de cirurgias e nas unidades neonatais de cuidados intensivos. No IPOCFG, E.P.E. não existem unidades unidades de cuidados intensivos nem unidades neonatais de cuidados intensivos. O serviço de Unidade de Cuidados Intermédios é uma enfermaria onde os doentes permanecem durante relativamente pouco tempo em relação ao tempo de internamento verificado noutras enfermarias, o que pode explicar a baixa taxa de infecção aqui verificada.

O serviço de Oncologia Médica apresentou uma taxa de infecção mais elevada do que a verificada nos serviços de Cirurgia (Cirurgia Cabeça e Pescoço, Cirurgia, Urologia,

Unidade de Cuidados Intermédios e Ginecologia). A enfermaria de Oncologia Médica é partilhada com doentes de várias especialidades como tal, é maior o fluxo e diversidade de profissionais de saúde que os assistem diariamente. O facto de os mesmos profissionais circularem por diferentes enfermarias contribuirá para a disseminação de eventuais agentes infecciosos entre diferentes áreas do hospital. Para além disso, neste serviço, encontram-se doentes no mesmo quarto (4 ou 5 doentes por quarto) com patologias bastantes diversas e diferentes entre si e com diferentes graus de imunossupressão o que faz com que a probabilidade de surgir uma infecção e de esta se tornar resistente à terapêutica farmacológica cresça significativamente. Os doentes são aqui internados para fazer ciclos de quimioterapia que não podem ser feitos em regime de ambulatório (duração dos tratamentos, agressividade da terapia e/ou estado geral do doente), ou seja, são doentes imunodeprimidos devido à administração de quimioterapia, logo mais susceptíveis à infecção. Por outro lado é importante referir que nas unidades de cirurgia, os doentes muitas vezes são sujeitos a antibioterapia profilática, o que, de certa forma, diminui o aparecimento de algumas infecções cujas poderiam, eventualmente, ser detectadas caso não estivessem a ser administrados antibióticos.

## **2. *E.coli***

Foram isoladas 30 *E.coli* em 29 doentes diferentes. É um bacilo Gram negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, e faz parte da flora comensal, estando presente no tracto gastrointestinal humano. A maioria das infecções por este microrganismo é endógena, ou seja, a flora microbiológica comensal individual é capaz de estabelecer infecções. É o principal causador de infecções urinárias nosocomiais.

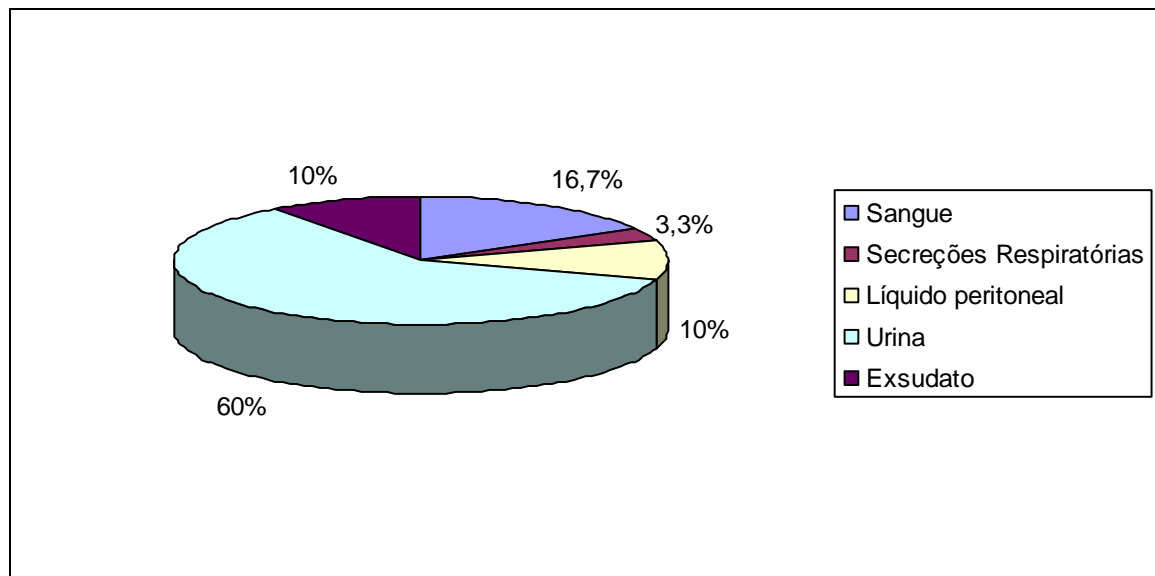


Figura 19: Distribuição dos isolados de *E.coli* de acordo com o local de infecção: sangue; secreções respiratórias; líquido peritoneal; urina e exsudato.

A maioria das infecções por *E.coli* registadas está associada às vias urinárias (n = 18-60%). Dos 18 isolados de *E.coli* recolhidos de amostras de urina, 11 deles foram de mulheres, tal como é demonstrado na Figura 19.

As infecções urinárias são mais comuns nas mulheres do que nos homens. O principal motivo destas infecções relaciona-se com questões anatómicas, a uretra da mulher é mais curta do que a do homem (a uretra feminina não é maior do que 5 cm, ao contrário da uretra masculina que tem cerca de 15 cm) e está mais próxima da zona vaginal e perianal, o que facilita a colonização dos microrganismos. A uretra funciona como uma barreira natural que impede que os microrganismos consigam ascender até à bexiga ou rins. Em mulheres jovens, sexualmente activas e que utilizam métodos contraceptivos como diafragma e/ou espermicidas o risco de infecção urinária é aumentado (vão alterar a flora bacteriana local e/ou impedir o esvaziamento eficaz da bexiga). Em mulheres mais velhas também existem factores que contribuem para o aumento do risco de infecções urinárias nomeadamente a menopausa (altera a flora vaginal). O uso de antibióticos também pode predispor para o surgimento deste tipo de infecção: os antibióticos provocam uma alteração na flora vaginal normal que favorece a multiplicação de microrganismos oportunistas (Chung, A. 2010). Os resultados apresentados estão concordantes com o que

está descrito na literatura. É importante realçar a presença deste microrganismo nas infecções sanguíneas (n = 5 – 16,7%).

A maior taxa de infecção foi registada no serviço de Oncologia Médica (n = 11 - 36,7%), seguido dos serviços de Radioterapia (n = 6 – 20%), Cirurgia (n = 5 – 16,7%), Cuidados Paliativos (n = 4 – 13,3%) e Ginecologia (n = 2 – 6,7%). Nos serviços de Urologia e Unidade de Cuidados Intermédios apenas se registou 1 isolado (3,3%). Quanto ao sexo, verificou-se que as mulheres apresentaram maior taxa de infecção do que os homens (55,2% e 44,9%, respectivamente). Este dado é facilmente explicável devido ao facto de a maior parte de *E.coli* ter sido isolada de urinas e de as mulheres serem mais susceptíveis a infecções urinárias.

Tabela 9: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de *E.coli*.

	Sensível	Sensibilidade Intermédia	Resistente
Amicacina	27 90,0%	3 10,0%	
Amoxicilina + ácido clavulânico	24 82,8%	1 3,4%	4 13,8%
Ampicilina	12 41,4%		17 58,6%
Cefalotina	14 48,3%	6 20,7%	9 31%
Cefepima	22 73,3%	3 10,0%	5 16,7%
Cefotaxima	21 72,4%	2 6,9%	6 20,7%
Ceftazidima	22 73,3%	2 6,7%	6 20,0%
Cefuroxima	20 69%	1 3,4%	8 27,6%
Cefuroxima Axetil	19 65,5%	2 6,9%	8 27,6%
Ciprofloxacina	16 53,3%	1 3,3%	13 43,3%
Gentamicina	25 83,3%		5 16,7%
Levofloxacina	17 58,6%	1 3,4%	11 38%
Meropenemo	29 96,7%		1 3,3%
Nitrofurantoína	27 93,2%	1 3,4%	1 3,4%
Norfloxacina	14 48,3%		15 51,7%
Piperacilina/Tazobactam	29 96,7%		1 3,3%
Tetraciclina	13 44,8%		16 55,2%
Tobramicina	23 76,7%		7 23,3%
Trimetoprim/Sulfametoxazol	20 66,7%		10 33,3%

Nota: apenas foram testados 29 isolados para amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, cefalotina, cefotaxima, cefuroxima, cefuroxima axetil, levofloxacina, nitrofurantoína,

norfloxacin e tetraciclina pelo que, nestes casos, o número total de isolados foi considerado 29.

De acordo com os dados expostos na Tabela 9, verificou-se que os antibióticos mais eficazes, com taxas mais altas de sensibilidade, são: meropenem (96,7%); nitrofurantoína (93,2%); amicacina (90,0%) e gentamicina (83,3%). De referir que nenhum dos isolados foi resistente à amicacina (aminoglicosídeo que faz parte do grupo de antibióticos inibidores da síntese proteica). A nitrofurantoína é um bacteriostático muito utilizado empiricamente para tratar infecções urinárias não complicadas – cistite – mas não é utilizado no tratamento de infecções urinárias altas – pielonefrites. O mecanismo de acção deste antibiótico afecta vários sistemas enzimáticos bacterianos, que por sua vez vão afectar o metabolismo, a síntese da parede celular e a síntese de DNA e RNA. Tem portanto uma actividade múltipla, o que justifica a baixa resistência bacteriana a este composto, apesar dos largos anos de utilização terapêutica (Bean, D. C. *et al.* 2008). Nas espécies isoladas, a nitrofurantoína mostrou ter uma elevada eficácia.

As combinações de  $\beta$ -lactâmicos com inibidores das  $\beta$ -lactamases testadas, piperacilina + tazobactam e amoxicilina + ácido clavulânico, apresentaram boas taxas de sensibilidade, 96,7% e 82,8%, respectivamente. Ainda que nesta última combinação já se tenham contabilizado 4 (13,8%) espécies resistentes e 1 (3,4%) estirpe com sensibilidade intermédia, facto que poderá alertar para um possível aumento das resistências a esta combinação de antibióticos.

Quanto ao grupo das cefalosporinas - cefalotina, cefuroxima, cefuroxima axetil, cefotaxima, ceftazidima e cefepima- os microorganismos isolados apresentaram as seguintes taxas de sensibilidade: 48,3%, 66,7%; 63,3%; 72,4%, 73,3% e 73,3% respectivamente. É visível a menor sensibilidade a cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina) do que em relação às de 3ª (cefotaxima e ceftazidima) e 4ª geração (cefepima), o que é facilmente explicável pelo facto de que à medida que se avança nas diferentes gerações o espectro alarga-se para Gram negativo (as cefalosporinas de 4ª geração são as mais activas).

No que concerne ao grupo das quinolonas – levofloxacin, ciprofloxacina e norfloxacina - a sensibilidade a este grupo de antibióticos já não é tão significativa como os grupos visados anteriormente: 58,6%, 53,3% e 44,3%. Em termos clínicos este dado é interessante, uma vez que a ciprofloxacina e a norfloxacina são usadas como antibióticos de 1ª linha no tratamento de infecções urinárias.

As percentagens de resistências verificadas nestes isolados são inferiores a 58,6%. As taxas de resistência mais elevadas foram detectadas para a ampicilina (58,6%) e tetraciclina (55,2%). O primeiro antibiótico é uma aminopenicilina pertencente à classe dos antibióticos antiparietais (grupo dos  $\beta$ -lactâmicos) e o segundo é um antibiótico pertencente à classe dos inibidores de síntese proteica.

Num estudo feito num hospital francês (University Hospital of Nîmes), no qual se estudou o perfil de sensibilidade de espécies de *E.coli* isoladas urina desde Novembro de 1998 até Fevereiro de 1999 (320 espécies no total), chegou-se à conclusão que os antibióticos mais eficazes para estes microrganismos são piperacilina + tazobactam, gentamicina, amicacina, cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (ceftazidima e cefepima) e quinolonas. Para o imipenemo as espécies de *E.coli* apresentaram 100% de sensibilidade. No presente estudo não foi testado o imipenemo, mas testou-se o meropenemo com o qual se verificou uma elevada taxa de sensibilidade (ambos pertencem ao grupo dos carbapenemos). Estas informações estão concordantes com os resultados apresentados, excepto no caso das quinolonas, em que as taxas de sensibilidade registadas não foram muito elevadas. (Sotto, A. *et al.* 2001). No entanto, um estudo mais recente, feito num hospital português (Centro Hospitalar do Nordeste – Unidade Hospitalar de Bragança), vem corroborar a ideia de que a susceptibilidade das espécies de *E.coli* às quinolonas se encontra reduzida. Neste estudo, foram analisadas todas as espécies de *E.coli* isoladas em urinas (quer de doentes de ambulatório, quer de doentes de internamento) no período de Abril de 2004 até Março de 2006. Neste artigo, é referido também a elevada taxa de susceptibilidade apresentada por *E.coli* ao imipenemo, amicacina, cefotaxima e nitrofurantoína além da baixa susceptibilidade às quinolonas e às cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina). Todas estas informações estão concordantes com os resultados apresentados no presente estudo (Correia, C. *et al.* 2007).

Um outro estudo, também interessante, foi realizado num hospital oncológico na Índia, onde foram analisadas 484 hemoculturas positivas de doentes de internamento. Este estudo demonstrou que *E.coli* é um dos microrganismos mais frequentemente isolados no sangue (nos casos de infecção) e que os os antibióticos mais eficazes foram o meropenemo e a amicacina e o menos eficaz foi a ciprofloxacina (Prabhash, K. *et al.* 2010).

Dos 30 isolados neste trabalho, 9 deles não apresentaram qualquer tipo de resistência aos antibióticos testados – espécies selvagens. Registaram-se 6 (20%) espécies produtoras de ESBL's, o que no conjunto das 30 espécies isoladas não deixa de ser um número significativo.

A resistência adquirida das espécies de *E.coli* deve-se principalmente a:

- (I) Produção de cefalosporinases do tipo AmpC que hidrolisam as cefalosporinas de largo espectro e as cefamicinas e conferem resistência ao ácido clavulânico, o que dificulta a escolha de antibióticos a utilizar nos casos de infecção por microrganismos produtores destas cefalosporinases;
- (II) Produção de ESBL, tais como TEM-1 ou TEM-2 e SHV-1 que conferem resistência às aminopenicilinas, carboxipenicilinas e cefalosporinas de 1ª e 2ª geração;
- (III) Produção de ESBL capazes de hidrolisar cefalosporinas de 4ª geração e monobactâmicos mas que não inactivam o ácido clavulânico. As ESBL's emergiram como um importante mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e criaram problemas graves a nível terapêutico. Estas evoluíram das classes TEM-1 ou TEM-2 e SHV-1, pela substituição de vários aminoácidos no seu centro activo. Há outras famílias de ESBL's que surgiram, tais como PER, VEB, TLA-1 e IBC (ceftazidimase) e CTX-M (cefotaxidimase). Esta última família tem vindo a aumentar muito rápida e significativamente em todo o mundo;

- (IV) Produção de  $\beta$ -lactamases do tipo IRT que derivam das TEM-1 e TEM-2 devido a mutações que resultam na perda de sensibilidade aos inibidores das  $\beta$ -lactamases e, conseqüentemente, às associações de  $\beta$ -lactâmicos com inibidores das  $\beta$ -lactamases (amoxicilina + ácido clavulânico e ticarcilina + ácido clavulânico) (Messai, Y. *et al.* 2006).

Um estudo de vigilância, realizado no período entre o ano de 2004 a 2006, e onde foram analisadas espécies produtoras de ESBL's em diferentes zonas geográficas, revelou que a emergência destas espécies tem vindo a aumentar desde o ano em que foram descritas pela primeira vez (1983). Revelou também que as zonas do mundo em que há maior frequência de *E.coli* produtoras de ESBL's são a América do Sul e Ásia. Na Europa e América do Norte a frequência de espécies produtoras de ESBL's é ligeiramente inferior (Coque, T. M. *et al.* 2008). Mais concretamente, no caso de Portugal, há estudos que estimam que a percentagem de espécies produtoras de ESBL's (*E.coli* e *Klebsiella pneumoniae*) é cerca de 34% (Khanfar H. S. *et al.* 2009).

### **3. *Staphylococcus coagulase negativa***

Das 25 isolados de *Staphylococcus coagulase negativa*, 11 (44%) foram *Staphylococcus epidermidis* e os restantes 14 (56%) distribuíram-se da seguinte forma: *Staphylococcus hominis* (n = 6 – 24%); *Staphylococcus capitis* (n = 3 – 12%); *Staphylococcus haemolyticus* (n = 2 – 8%); *Staphylococcus warneri* (n = 2 – 8%) e *Staphylococcus saprophyticus* (n = 1 – 4%). Os *Staphylococcus* cocos Gram positivo, imóveis, anaeróbios facultativos e catalase positiva. Pertencem à família *Micrococcaceae* e são agentes causadores de várias patologias que variam de infecções cutâneas superficiais a doenças sistémicas letais.

A enfermaria onde se verificaram mais casos de infecção por *Staphylococcus coagulase negativa* foi a de Oncologia Médica (n = 15 - 60%) e foi no sexo masculino que se verificou uma maior incidência de infecção por estes microrganismos 17 (68%) nos homens e 8 (32%) nas mulheres.



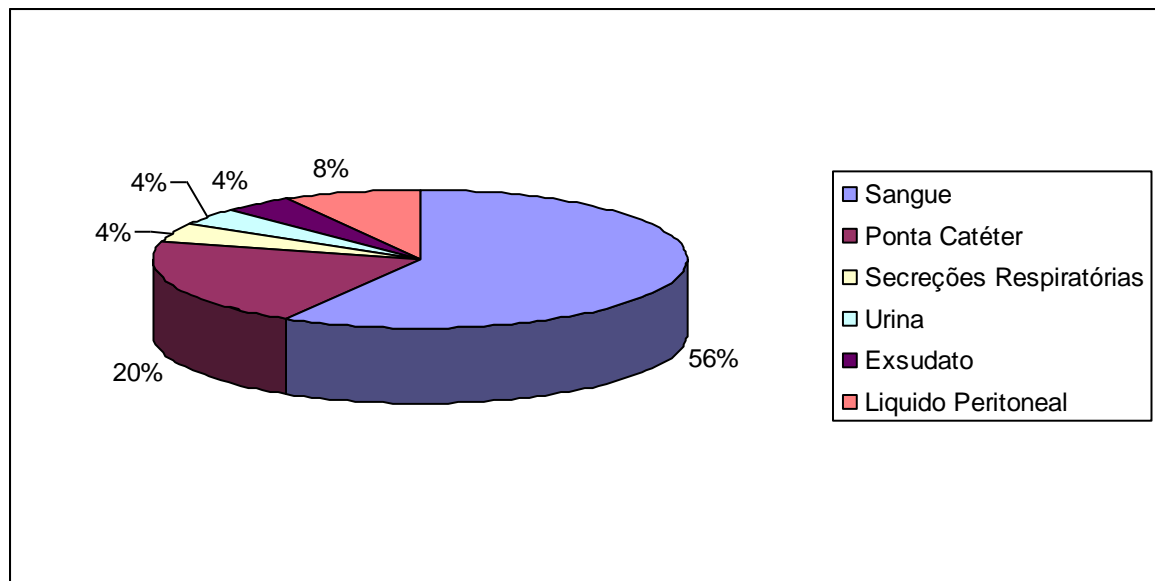


Figura 20: Distribuição dos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa de acordo com o local de infecção: sangue; ponta de cateter; secreções respiratórias; urina; exsudato e líquido peritoneal.

O gráfico da Figura 20 mostra o que é descrito em vários estudos: os *Staphylococcus* coagulase negativa são frequentemente isolados de hemoculturas. Neste estudo foram isoladas 14 espécies no sangue (2 destas amostras foram colhidas no cateter venoso central) e 5 espécies foram isoladas de ponta de cateter. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de um dos factores de virulência dos *Staphylococcus* coagulase negativa ser a produção de slime, uma substância mucosa, polissacarídea que facilita a aderência aos cateteres e outros materiais sintéticos. Nos restantes produtos biológicos o número de isolados não foi significativo: apenas um isolado em secreções respiratórias, exsudato e urina (*Staphylococcus saprophyticus* numa mulher de 43 anos, o que está de acordo com a literatura, uma vez que estes microrganismos são agentes causadores de infecções urinárias em mulheres jovens sexualmente activas) e duas espécies isoladas no líquido peritoneal (*Staphylococcus epidermidis*).

Tabela 10: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de *Staphylococcus coagulase negativa*

	Sensível	Sensibilidade Intermédia	Resistente
Benzilpenicilina	3 12,0%		22 88,0%
Clindamicina	16 64,0%		9 36,0%
Eritromicina	12 48,0%		13 52,0%
Fosfomicina	11 44,0%		14 56,0%
Gentamicina	16 64,0%		9 36,0%
Levofloxacina	11 44,0%	7 28,0%	7 28,0%
Linezolid	<b>25 100%</b>		
Mupirocina	<b>25 100%</b>		
Nitrofurantoína	23 92,0%	2 8,0%	
Oxacilina	8 32,0%		17 68,0%
Rifampicina	<b>25 100%</b>		
Teicoplanina	<b>25 100%</b>		
Tetraciclina	15 60,0%		10 40,0%
Tigeciclina	<b>25 100%</b>		
Tobramicina	13 52,0%		12 48,0%
Vancomicina	<b>25 100%</b>		
Ácido Fusídico	10 40,0%	4 16,0%	11 44,0%

Os *Staphylococcus coagulase negativa* isolados apresentaram uma sensibilidade de 100% a vários antibióticos de classes diferentes, tais como os antibióticos antiparietais (teicoplanina e vancomicina), antibióticos inibidores da síntese proteica (mupirocina, linezolid e tigeciclina) e também aos antibióticos inibidores da síntese de ácidos nucleicos (rifampicina), tal como é demonstrado na Tabela 10. Verificou-se também uma boa sensibilidade à nitrofurantoína. No que concerne às taxas de resistência apresentadas, verificou-se que muitos dos isolados eram resistentes à benzilpenicilina (88%) e também à oxacilina (68%).

Tendo em conta que a maior parte destes microrganismos foram isolados de hemoculturas (e alguns de colheitas de sangue feitas directamente dos cateteres), analisando as taxas de resistência (especialmente à benzilpenicilina e oxacilina), reconhecendo a sua facilidade de aderência aos cateteres e sabendo que vários estudos suportam que se verifica um aumento nas taxas de infecção sanguínea por *Staphylococcus*

coagulase negativa, estes dados podem reflectir uma mudança no modo como se interpreta a sua presença como agente causador de infecção sanguínea, podendo este passar de contaminante da pele a microrganismo com significado clínico (Abdel –Fattah 2005).

Um estudo do ano de 2007, realizado num hospital oncológico na Índia, onde foram analisadas 484 hemoculturas positivas de doentes de internamento, revelou que *Staphylococcus* coagulase negativa são microrganismos que surgem com frequência associados a infecções sanguíneas e que os antibióticos mais eficazes são vancomicina, teicoplanina e linezolid (no presente estudo estes microrganismos apresentaram taxas de 100% de sensibilidade aos antibióticos citados). O antibiótico para o qual houve maior taxa de resistência foi a eritromicina (dado que está concordante com o encontrado neste estudo) (Prabhash, K. *et al.* 2010).

#### **4. *Pseudomonas aeruginosa***

Neste trabalho foram isoladas 24 *Pseudomonas aeruginosa* de 19 doentes diferentes. *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram negativo, estritamente aeróbio e que pertence à família *Pseudomonadaceae* (mistura complexa de oportunistas vegetais, animais e patogénicos humanos). São organismos ubíquos, encontrados no solo, matéria orgânica em decomposição, vegetação e água. No entanto, são frequentemente causadores de infecções nosocomiais, tais como pneumonia; infecções urinárias e infecção de feridas cirúrgicas.

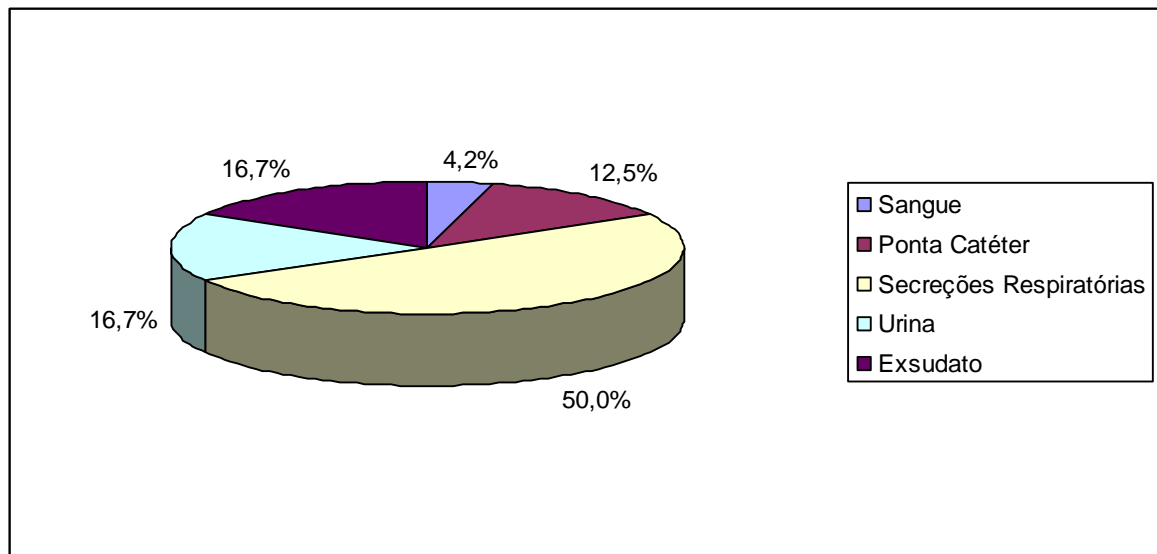


Figura 21: Distribuição dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de acordo com o local de infecção: sangue; ponta de catéter; secreções respiratórias; urina e exsudato.

Analisando a Figura 21, constata-se que metade dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* ( $n = 12 - 50\%$ ) foram recolhidas de secreções respiratórias. Também foram isoladas *Pseudomonas aeruginosa* em urina e exsudato (em cada uma das amostras foram isoladas 4 espécies, 16,7%). No sangue e em ponta de cateter foram isoladas 1 (4,2%) e 3 (12,5%) espécies, respectivamente.

Os serviços em que se verificou uma maior taxa de infecção foram os de Cirurgia Cabeça e Pescoço, no qual foram isoladas 8 espécies (33,3%) e o de Cuidados Paliativos, 6 espécies (25%). Nos serviços de Oncologia Médica e Radioterapia foi isolado o mesmo número de espécies, 4 (16,7%) em cada um deles. Na Unidade de Cuidados Intermédios e no serviço de Cirurgia foi registada uma baixa taxa de infecção ( $n = 1 - 4,2\%$ ). Mais uma vez, verificou-se que houve mais homens infectados ( $n = 14 - 73,5\%$ ) do que mulheres ( $n = 5 - 26,3\%$ ).

Tabela 11: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.

	Sensível	Sensibilidade Intermédia	Resistente
Amicacina	22 91,7%		2 8,3%
Aztreonamo	14 58,3%	8 33,3%	2 8,3%
Cefepima	17 70,8%	5 20,8%	2 8,3%
Cefpiroma	7 29,2%	15 62,5%	2 8,3%
Ceftazidima	17 70,8%	5 20,8%	2 8,3%
Ciprofloxacina	14 58,3%	3 12,5%	7 29,2%
Colistina	22 91,7%		2 8,3%
Gentamicina	17 70,8%	1 4,2%	6 25,0%
Imipenemo	20 83,3%		4 16,7%
Isepamicina	22 91,7%		2 8,3%
Meropenemo	20 83,3%	1 4,2%	3 12,5%
Netilmicina	16 66,7%		8 33,3%
Peploxacina	13 54,2%	1 4,2%	10 41,7%
Piperacilina	16 66,7%	4 16,7%	4 16,7%
Piperacilina/Tazobactam	16 66,7%	4 16,7%	4 16,7%
Ticarclina	12 50,0%	3 12,5%	9 37,5%
Ticarclina/Ácido Clavulânico	12 50,0%	4 16,7%	8 33,3%
Tobramicina	17 70,8%	4 16,7%	3 12,5%
Trimetoprim/Sulfametoxazol			<b>24 100,0%</b>

De acordo com os resultados expostos na Tabela 11, as taxas mais altas de sensibilidade (91,7%) foram registradas para os aminoglicosídeos (amicacina e isepamicina) e para um antibiótico pertencente à classe dos antimembranares – colistina (polimixina E). Foi também observada uma boa sensibilidade ao grupo dos carbapenemos (imipenemo e meropenemo) em 83,3% dos isolados (n = 20).

Para todos os antibióticos testados, foram sempre encontradas espécies resistentes. E também não se verificou nenhum antibiótico ao qual fossem sensíveis todas as espécies isoladas. Estes dados são, de certa forma, preocupantes, uma vez que este microrganismo é um dos mais frequentemente associado a infecção nosocomial e a diminuição de opções terapêuticas pode ocorrer devido a um eventual aumento de resistências aos antibióticos e à diminuição da eficácia de antibióticos.

*Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo que apresenta resistência natural a muitos antibióticos de uso clínico, incluindo a maioria das penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, rifampicina, aminoglicosídeos, macrólidos, lincosamidas, sulfonamidas e trimetoprim, entre outros. Além disso desenvolve rapidamente e com frequência mutações cromossômicas e adquire material genético exógeno que lhe confere resistência a muitos dos antibióticos. São vários os mecanismos de resistência de *Pseudomonas aeruginosa*: produção de  $\beta$ -lactamases de largo espectro; alteração das PBP; mutações das porinas; mutações das DNA girases e alterações de permeabilidade (Gamero Delgado M.C. *et al.* 2007).

Todos os isolados foram resistentes ao trimetoprim/sulfametoxazol (resistência natural). Verificou-se resistência à pefloxacina em 10 dos casos isolados (41,7%). Quanto às penicilinas antipseudomonas e às combinações de penicilinas-antipseudomonas/inibidores de  $\beta$ -lactamases detectaram-se já taxas de resistência consideráveis: piperacilina (n = 4 – 16,7%); piperacilina/tazobactam (n = 4 – 16,7%); ticarcilina (n = 9 - 37,5%) e ticarcilina/ácido clavulânico (n = 8 – 33,3%). Contabilizaram-se um número significativo de espécies com sensibilidade intermédia aos antibióticos supracitados (entre 12,5% a 16,7%), o que reforça um possível aumento da falta de eficácia dos mesmos e um provável ponto de viragem da sensibilidade para a resistência a estes antibióticos e combinação de antibióticos. É também importante apontar que não houve um alargamento de espectro nas penicilinas antipseudomonas aquando da adição dos inibidores de  $\beta$ -lactamases (as taxas de resistências foram iguais na piperacilina e na associação piperacilina/tazobactam e praticamente as mesmas no caso da ticarcilina isolada e ticarcilina/ácido clavulânico). Vários estudos mostram que há uma correlação muito estreita entre o consumo dos antibióticos antipseudomonas e o aumento da resistência aos mesmos. Os antibióticos antipseudomonas, bem como as combinações destes com os inibidores de  $\beta$ -lactamases são muitas vezes utilizados na antibioterapia empírica. Um dos factores de risco para a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos é a exposição prévia a estes antibióticos (Kalle H. *et al.*, 2008).

Um estudo de 2005 de um hospital espanhol (Hospital Universitario Reina Sofia, Córdoba) comparou os perfis de sensibilidade de espécies de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de amostras biológicas de doentes de internamento. Os resultados apresentados neste estudo vão de encontro aos dados aqui apresentados: os antibióticos mais eficazes nestas espécies são os carbapenemos (meropenemo e imipenemo) (Gamero Delgado M.C. *et al.* 2007).

## **5. *S. aureus***

Foram isoladas 24 *S.aureus* em 20 doentes diferentes. Os *S.aureus* são cocos Gram positivos que pertencem à família *Micrococcaceae*. Uma das suas características mais importantes é a produção de uma enzima, a coagulase. Esta é capaz de converter directamente o fibrinogénio em fibrina insolúvel e causar o agrupamento de *S.aureus*. Esta camada de fibrina formada ao redor do abscesso estafilocócico localiza a infecção, protegendo os organismos da fagocitose. A coagulase é usada como um marcador de virulência, separando o *S.aureus* das outras espécies de estafilococos (*Staphylococcus* coagulase- negativos). Esta bactéria faz parte da flora comensal. É um importante microrganismo causador de infecção hospitalar, estando envolvido em infecções sanguíneas, das vias respiratória inferiores, da pele, dos tecidos moles, de catéteres venosos centrais e podem também causar pneumonia nos doentes com ventilação mecânica.

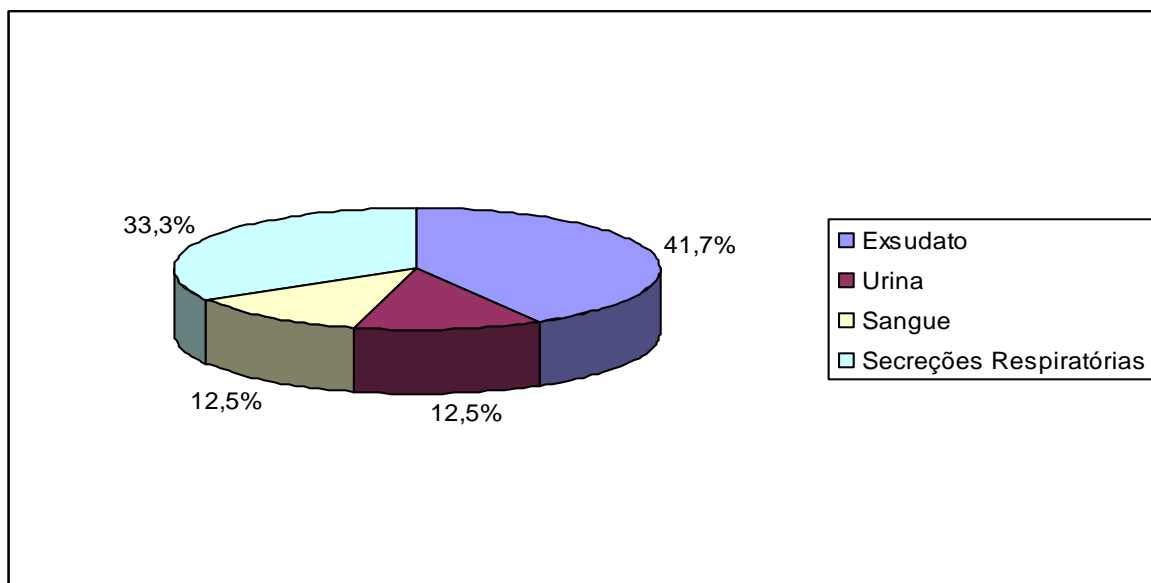


Figura 22: Distribuição dos isolados de *S.aureus* isoladas de acordo com o local de infecção: exsudato; urina; sangue e secreções respiratórias.

*S.aureus* foi mais frequentemente isolado em exsudato (10 espécies) e em secreções respiratórias (8 espécies). Na urina e no sangue foram isoladas 3 espécies em cada um destes produtos (12,5%), o que é demonstrado na Figura 22.

Os serviços onde estes microrganismos foram mais frequentemente isolados foram o de Oncologia Médica (n = 10 – 41,7%) e o de Radioterapia (n = 5 - 20,8%). Nos serviços de Cirurgia, Cuidados Paliativos e Cirurgia Cabeça e Pescoço foram isolados 3 espécies em cada um deles (12,5%). A taxa de infecção foi de 75% nos homens (15 episódios) e 25% nas mulheres (5 episódios).



Tabela 12: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de *S.aureus*.

	Sensível	Sensibilidade Intermédia	Resistente
Benzilpenicilina			<b>24 100%</b>
Clindamicina	7 29,2%		17 70,8%
Eritromicina	7 29,2%		17 70,8%
Fosfomicina	<b>24 100%</b>		
Gentamicina	<b>24 100%</b>		
Levofloxacina	5 20,8%	2 8,3%	17 70,8%
Linezolid	<b>24 100%</b>		
Moxifloxacina	7 29,2%		17 70,8%
Mupirocina	<b>24 100%</b>		
Nitrofurantoína	21 87,5%	3 12,5%	
Oxacilina	5 20,8%		19 79,2%
Rifampicina	23 95,8%	1 4,2%	
Teicoplanina	23 95,8%		1 4,2%
Tetraciclina	22 91,7%		2 8,3%
Tigeciclina	<b>24 100%</b>		
Tobramicina	23 95,8%		1 4,2%
Trimetoprim/Sulfametoxazol	<b>24 100%</b>		
Vancomicina	<b>24 100%</b>		
Ácido Fusídico	<b>24 100%</b>		

Como se pode observar na Tabela 12, os 24 isolados, todos foram sensíveis à vancomicina, fosfomicina, ao trimetoprim/sulfametoxazol e aos seguintes antibióticos inibidores da síntese proteica: gentamicina; linezolid; mupirocina; tigeciclina e ácido fusídico.

Verificaram-se também elevadas taxas de sensibilidade aos seguintes antibióticos: rifampicina (n=23-95,8%); teicoplanina (n = 23 - 95,8%); tobramicina (n = 23 - 95,8%); tetraciclina (n = 22 - 91,7%) e nitrofurantoína (n = 21 - 87,5%).

Todos os isolados foram resistentes à benzilpenicilina. Os grupos de antibióticos com maiores taxas de resistência foram a oxacilina (79,2%), os pertencentes ao grupo dos inibidores da síntese proteica, mais especificamente os macrólidos (eritromicina) e as lincosamidas (clindamicina) e os pertencentes ao grupo dos inibidores da síntese de ácidos

nucleicos, nomeadamente o grupo das quinolonas (moxifloxacina e levofloxacina), com taxas de 70,8% em todos estes últimos 4 antibióticos citados.

Resistência aos macrólidos e lincosamidas – estes antibióticos foram introduzidos em 1952, constituindo um grupo de antibióticos colectivamente chamados de macrólidos, lincosamidas e estreptograminas (MLS). São quimicamente diferentes mas possuem mecanismos de acção e resistência análogos (Schito, G.C. 2006).

O mecanismo de acção dos MLS é ao nível da síntese proteica. Dadas as diferenças entre os ribossomas bacterianos (procariotas) e das células humanas (eucariotas) é possível a utilização terapêutica destes antibióticos sem efeitos graves para o hospedeiro. O complexo ribossomal bacteriano 70S é formado pela associação das subunidades 30S e 50S. Esta última é constituída por rRNA 5S (aproximadamente 120 nucleótidos), rRNA 23S (aproximadamente 2900 nucleótidos) e por 31 proteínas. O alvo de acção dos antibióticos é a subunidade 50S, isto é o antibiótico liga-se a segmentos de rRNA 23S inibindo a transpeptidação e a translocação no processo de síntese proteica bacteriana (Schito, G.C. 2006).

Como algumas pessoas são alérgicas à penicilina o grupo de antibióticos MLS surgiu como uma boa alternativa para tratar infecções estafilocócicas. No entanto, a resistência ao MLS surgiu rapidamente após a sua introdução. Existem dois fenótipos de resistência ao MLS nos *S. aureus*. O primeiro é atribuído ao gene *erm* (*ermA*, *ermB* e *ermC*), cuja expressão origina uma enzima (23S rRNA metilase), que é responsável pela metilação do resíduo de adenina em rRNA 23S. Como resultado, verifica-se o impedimento da ligação do antibiótico ao seu alvo ribossomal, sendo este o mecanismo mais frequente. O segundo mecanismo é mediado pelo gene *msrA* e envolve a actividade das bombas de efluxo do *S. aureus*, que “expulsam” o antibiótico para o meio extracelular. Desta forma, a concentração de antibiótico no meio intracelular não é suficiente para que este se ligue ao seu alvo (Schito, G.C. 2006).

Resistência às quinolonas – os alvos principais das quinolonas são as enzimas topoisomerases. Como se sabe, o nucleóide bacteriano é constituído por uma molécula de

DNA circular. As enzimas topoisomerases – DNA girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV participam no superenrolamento do DNA, isto é fundamental para a replicação do DNA na célula intacta. Ao actuarem contra as topoisomerases, as quinolonas interferem com o enrolamento do DNA, impedindo a replicação e a transcrição do mesmo – actividade bactericida (Schito, G.C. 2006).

A resistência às quinolonas emergiu rapidamente, em especial entre MRSA, devido à aquisição de mutações das enzimas alvo. Os genes responsáveis por estas mutações são: *parC* (expressão de topoisomerase IV) e *gyrA* ou *gyrB* (expressão de DNA girase). As mutações traduzem-se num decréscimo de afinidade entre as quinolonas e o seu alvo de acção. Elas ocorrem rapidamente durante a terapêutica com fluoroquinolonas e podem ser o factor mais significativo para a limitação do seu uso (Schito, G.C. 2006).

Estudo demonstram que, no caso de *S.aureus* isolados em hemoculturas, os antibióticos mais eficazes são a vancomicina e teicoplanina e o menos eficaz pertence ao grupo das quinolonas (ciprofloxacina) (Prabhash, K. *et al.* 2010).

Foi detectada resistência à oxacilina em 19 microrganismos (79,2%) com o respectivo teste de screening de cefoxitina positivo. O mesmo será dizer que das 24 amostras, 19 eram de MRSA, que é um número preocupante. Nestes doentes, a vancomicina ou a teicoplanina são usados como fármacos de último recurso.

Num estudo realizado a nível Europeu, durante o período de Janeiro de 1999 a Dezembro de 2002, foram contabilizadas as percentagens de MRSA. Neste estudo participaram 495 hospitais de 26 países diferentes. Os países com maior prevalência de espécies MRSA foram: Grécia (44,4%); Inglaterra (41,5%); Itália (40,9%) e Portugal (34,7%). Os países com menos prevalência de espécies MRSA foram: Dinamarca (0,6%); Holanda (0,6%); Suécia (0,8%); Áustria (8,8%) e Alemanha (13,8%). Bélgica e Espanha apresentam taxas de 23,6 e 24,8%, respectivamente (Schito, G.C. 2006). Estudos mais recentes estimam que em Portugal a prevalência de MRSA em infecções invasivas nosocomiais é de cerca de 53%, uma das mais altas da Europa (Tavares DA, *et al.* 2010).

## 6. *Candida spp.*

Foram isoladas 17 *Candida spp.*, de 15 doentes diferentes. Estes microrganismos são fungos que fazem parte da flora comensal, mas que podem tornar-se patogénicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro (por exemplo, comprometimento de barreiras de defesa naturais, secundárias a queimaduras ou procedimentos médicos invasivos) e no caso dos doentes imunocomprometidos. As manifestações clínicas das infecções causadas por estes fungos podem ir desde infecção local das mucosas até à infecção sanguínea.

Dos 17 isolados de *Candida spp.* 11 (64,7%) são *Candida albicans* e os restantes 6 (35,3%) isolados são espécies não-albicans: 3 (17,6%) *Candida krusei*; 2 (11,8%) *Candida glabrata* e 1 (5,9%) *Candida parapsilosis*.

Recentemente, verificou-se um aumento da frequência de espécies não-albicans como agentes causadores de infecções sanguíneas, tais como: *Candida glabrata*; *Candida krusei*; *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Vários estudos demonstram que há um risco aumentado de candidémias nos doentes oncológicos. Com efeito, as candidémias invasivas são uma grande ameaça para doentes com cancro, especialmente nos doentes com tumores hematológicos (este grupo de doentes apresentam graves distúrbios hematológicos, e os neutrófilos e linfócitos mononucleares não são capazes de combater estes microrganismos).

O isolamento de espécies “não-albicans” em doentes oncológicos supostamente advém do uso em larga escala de antifúngicos, desde o início dos anos 90. Desde esta altura que se recorre aos antifúngicos de forma profilática antes de transplantes de células estamina hematopoiéticas e como prevenção de episódios de neutropenia febril. No entanto, há outros estudos que demonstram que este não é o factor principal para a emergência de espécies não-albicans. Por exemplo, *Candida parapsilosis* está fortemente associada ao uso de cateteres venosos centrais e *Candida tropicalis* está associada a doentes oncológicos (especialmente doentes neutropénicos com inflamações das mucosas) mesmo antes da introdução do fluconazol na prática clínica (Pasqualotto, A.C. *et al.* 2006).

Investigações anteriores sugerem que os factores que mais predispõem para infecções sanguíneas por espécies não-*albicans* são: anterior exposição a antifúngicos e outros antibióticos, especialmente vancomicina e piperacilina/tazobactam; idade (doentes muito jovens ou idosos) e doença oncológica de base (especialmente tumores hematológicos) (Choi, H.K. *et al.* 2009).

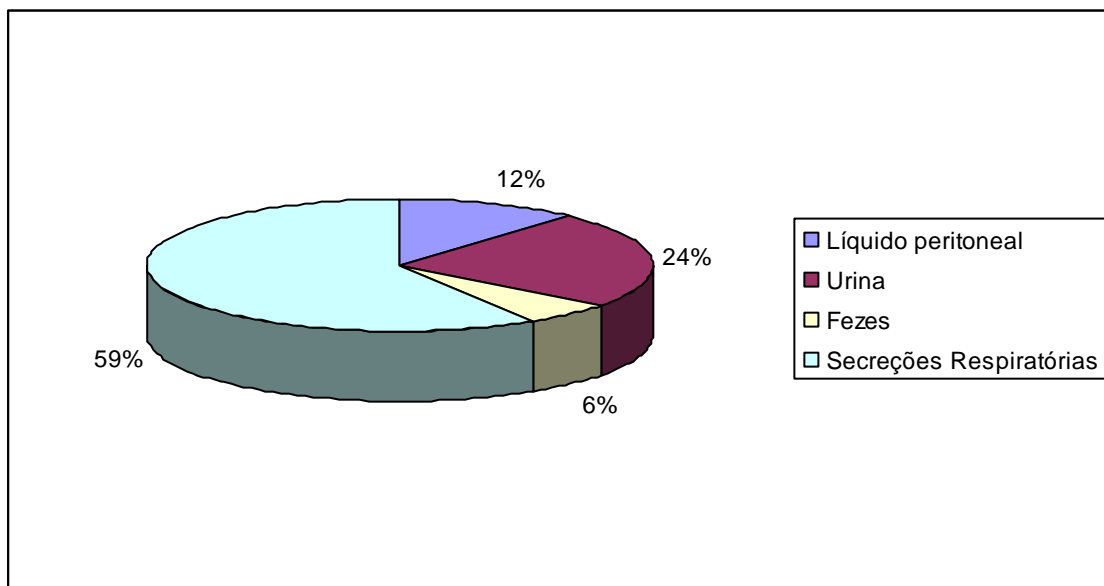


Figura 23: Distribuição das espécies de *Candida spp.* isoladas de acordo com o local de infecção: líquido peritoneal; urina; fezes; secreções respiratórias.

Curiosamente, como se pode observar na Figura 23, nenhum dos isolados (quer *Candida albicans* quer espécies não-*albicans*), foram isoladas de hemoculturas, sendo a maior parte isolada de secreções respiratórias (n = 10 – 58,8%) e algumas de urina (n = 4 – 23,5%). O local onde se verificaram mais episódios de infecção por *Candida spp.* foi o internamento de Oncologia Médica (n = 8 – 47,1%). As infecções por espécies de *Candida* tiveram uma maior incidência nos homens (n=10 – 66,7%) do que nas mulheres (n = 5 – 33,3%).

As únicas resistências observadas foram nos três isolados de *Candida krusei*, todos com resistência ao fluconazol. De facto, *Candida krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol e possui um decréscimo de susceptibilidade aos outros antifúngicos (das três espécies isoladas, todas apresentaram sensibilidade intermédia à fluocitosina). Assim, é

fácil compreender o aumento da dificuldade em termos de escolha terapêutica associada a esta espécie. *Candida glabrata* é relativamente resistente ao fluconazol devido a mecanismos de efluxo dependentes de energia. Neste estudo as espécies de *Candida glabrata* isoladas são sensíveis ao fluconazol. A emergência de fungémias provocadas por *Candida glabrata* e *Candida krusei* representa sérias complicações na terapêutica (Choi, H.K. *et al.* 2009).

## **7. *Enterococcus faecalis***

Foram encontrados 17 *Enterococcus faecalis* em 15 doentes. Este microrganismo é um coco Gram positivo que faz parte do género *Streptococcus* e distingue-se das restantes espécies de estafilococos por não produzirem a enzima catalase. A classificação deste vasto género pode basear-se tendo em conta diferentes esquemas: apresentação clínica (piogénicos, orais e entéricos); propriedades serológicas (grupos A, B, C, D, F e G de Lancefield); padrões hemolíticos (hemólise completa  $\beta$ , hemólise incompleta  $\alpha$  e ausência de hemólise  $\gamma$ ) e propriedades bioquímicas. *Enterococcus faecalis* fazem parte do grupo D de Lancefield e são microrganismos que conseguem sobreviver em condições adversas e resistentes a vários antibióticos. Podem ser encontrados em pequenos números nas vias respiratórias superiores e intestino delgado e em grandes números no intestino grosso. São responsáveis por infecções urinárias, abscessos intra-abdominais e feridas.

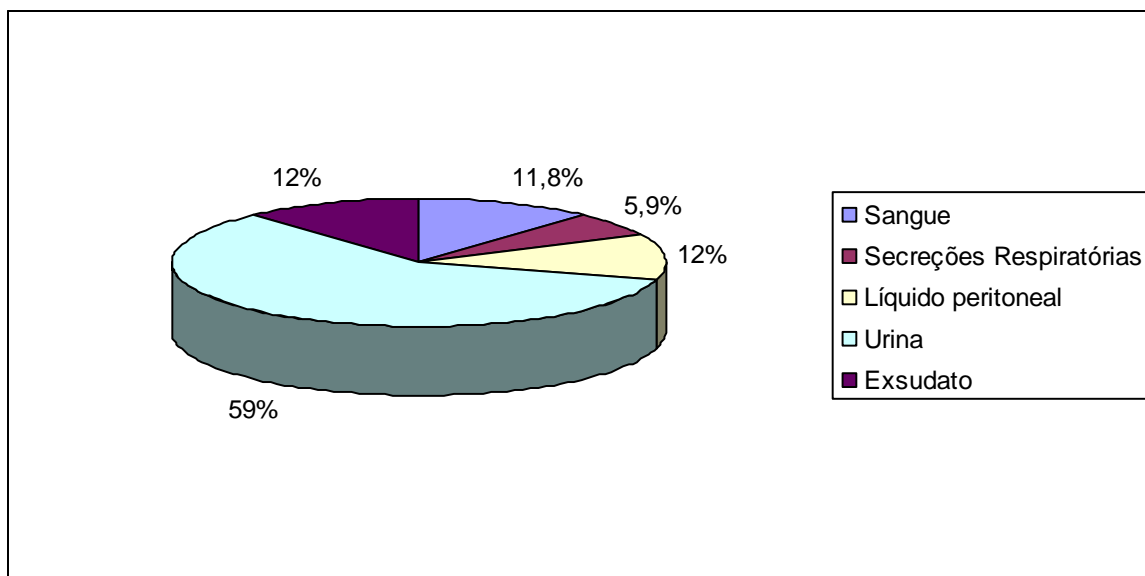


Figura 24: Distribuição dos isolados de *Enterococcus faecalis* de acordo com o local de infecção: sangue; secreções respiratórias; líquido peritoneal; urina e exsudato.

De acordo com a Figura 24, a maior parte dos isolados foram recolhidos de amostras de urina ( $n = 10 - 58,8\%$ ), mas também foram isoladas espécies do sangue ( $n = 2 - 11,8\%$ ); exsudato ( $n = 2 - 11,8\%$ ); líquido peritoneal ( $n = 2 - 11,8\%$ ) e secreções respiratórias ( $n = 1 - 5,9\%$ )

No hospital, os serviços com maiores taxas de infecção para estes microrganismos foram os serviços de Oncologia Médica ( $n = 7 - 41,2\%$ ); Radioterapia ( $n = 4 - 23,5\%$ ) e Cuidados Paliativos ( $n = 4 - 23,5\%$ ). Foram também isoladas 2 espécies no serviço de Cirurgia (11,8%). A infecção para o sexo masculino foi de cerca de 53,3% (8 doentes) e de 46,7% para as mulheres (7 doentes).

Tabela 13: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de *Enterococcus faecalis*.

	Sensível	Sensibilidade Intermédia	Resistente
Ampicilina	12 80,0%		3 20,0%
Ampicilina/sulbactam	<b>15 100%</b>		
Benzilpenicilina	12 80,0%		3 20,0%
Cefuroxima			<b>15 100%</b>
Cefuroxima Axetil			<b>15 100%</b>
Clindamicina			<b>17 100%</b>
Eritromicina	5 29,4%	6 35,3%	6 35,3%
Imipenemo	<b>15 100%</b>		
Levofloxacina	12 70,6%		5 29,4%
Linezolid	13 76,5%	3 17,6%	1 5,9%
Nitrofurantoína	16 94,1%	1 5,9%	
Quinupristina/Dalfopristin		4 26,6%	11 73,3%
Teicoplanina	16 94,1%		1 5,9%
Tetraciclina	1 5,9%		16 94,1%
Tigeciclina	<b>17 100%</b>		
Vancomicina	15 88,2%		2 11,8%

Nota: apenas foram testados 15 isolados para a ampicilina, ampicilina/sulbactam, benzilpenicilina, cefuroxima, cefuroxima axetil, Imipenemo e quinupristina/dalfopristin, pelo que, nestes casos o número total de espécies foi considerado 15.

Todos estes microrganismos foram sensíveis à tigeciclina, imipenemo e à associação ampicilina/sulbactam, como se pode observar na Tabela 13. A ampicilina utilizada isoladamente tem uma taxa de sensibilidade menor ( $n = 12 - 80\%$ ) do que quando associada ao sulbactam, o que reforça o facto de que este inibidor das  $\beta$ -lactamases aumenta o espectro de acção da ampicilina.

Comprovou-se uma boa sensibilidade dos isolados à nitrofurantoína ( $n = 16 - 94,1\%$ ), à teicoplanina ( $n = 16 - 94,1\%$ ), à vancomicina ( $n = 15 - 88,2\%$ ) e à benzilpenicilina ( $n = 12 - 80\%$ ). A nível de emergência de resistência aos antibióticos, o caso que suscita mais preocupação e atenção é a resistência à vancomicina das espécies de *Enterococcus faecalis*, uma vez que a vancomicina é considerada como uma droga de último recurso contra estes microrganismos (Davis, D. *et al.* 2001). No presente estudo



apenas foram registadas 2 espécies resistentes à vancomicina (11,8%) e a taxa de sensibilidade a este antibiótico foi alta (n = 15 – 88,2%). É um dado que deve ser considerado e analisado, mas, no entanto, não é um número alarmante. Até porque nestes casos concretos das espécies analisadas, há antibióticos com os quais se verificam taxas de sensibilidade de 100% (possíveis opções terapêuticas).

No que diz respeito às resistências encontradas, todas as estripes foram resistentes às cefalosporinas de 2ª geração (cefuroxima, cefuroxima axetil) e à clindamicina (lincosamida que pertence à classe de antibióticos inibidores da síntese proteica). A resistência das espécies de *Enterococcus faecalis* à tetraciclina e à quinupristina/dalfopristin foi também elevada (n = 16 - 94,1%) e (n = 11 - 73,3%), respectivamente. Embora haja muitos mecanismos envolvidos na multiresistência destas espécies, a superexpressão de bombas de efluxo são as que mais contribuem para os mecanismos de resistência.

A quinupristina e a dalfopristina, respectivamente estreptogramina B e A, são derivadas da pristinamicina (primeira estreptogramina a ser introduzida na terapêutica) e pertencem ao grupo MLS, tendo algumas semelhanças com os macrólidos e lincosamidas. São antibióticos inibidores da síntese proteica, que se ligam irreversivelmente à subunidade 50S dos ribossomas bacterianos. Pensa-se que a resistência a estes antibióticos advenha do uso abusivo de um outro antibiótico, a virginiamicina, uma estreptogramina muito semelhante à pristinamicina e que foi usada muito tempo em rações para alimentação de animais (Davis, D. *et al.* 2001).

### **8. *Klebsiella pneumoniae***

No presente estudo foram isoladas 13 *Klebsiella pneumoniae* em 10 doentes diferentes. Os membros pertencentes ao género *Klebsiella* são bacilos Gram negativo, não móveis que pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Estes microrganismos encontram-se na água, solo e plantas são patogénicos para os animais e Homem (podem colonizar a pele, faringe ou tracto gastrointestinal). Têm uma cápsula proeminente que é responsável pela aparência mucóide das colónias isoladas em agar mas que funciona também como um

factor de virulência destes organismos *in vivo*. Maioritariamente estão envolvidas em infecções respiratórias, mas também são responsáveis por infecções das vias urinárias e feridas.

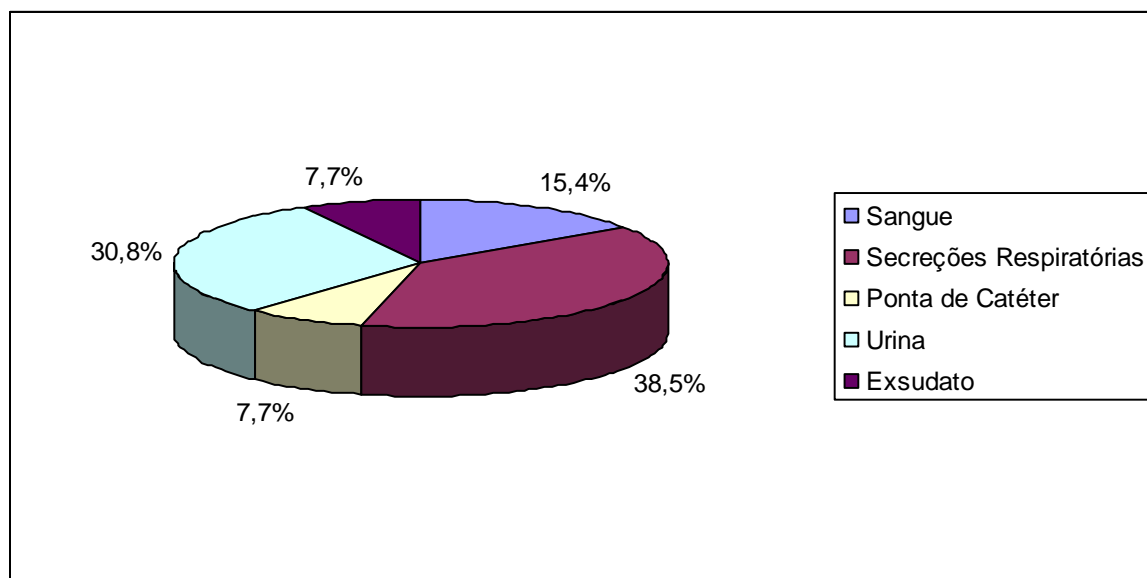


Figura 25: Distribuição dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* de acordo com o local de infecção: sangue; secreções respiratórias; ponta de cateter; urina e exsudato.

Tal como seria de esperar, a maioria das espécies foram isoladas de secreções respiratórias ( $n = 5$  - 38,5%) e de urina ( $n = 4$  - 30,8%). Foram também isoladas espécies do sangue (2), exsudato (1) e ponta de cateter (1), o que está descrito na Figura 25.

Os 13 isolados de *Klebsiella pneumoniae* foram isolados de vários serviços: Oncologia Médica ( $n = 4$  – 30,8%); Radioterapia ( $n = 3$  – 23,1%); Cirurgia Cabeça e Pescoço ( $n = 2$  – 15,4%); Cuidados Paliativos ( $n = 2$  – 15,4%); Cirurgia ( $n = 1$  – 7,7%) e Unidade de Cuidados Intermédios ( $n = 1$  – 7,7%). Os membros do sexo masculino foram mais afectados por este tipo de infecção do que os do sexo feminino (6 dos doentes foram homens, 60% e 4 dos doentes foram mulheres, 40%).

Tabela 14: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de *Klebsiella pneumoniae*.

	Sensível	Sensibilidade Intermédia	Resistente
Amicacina	7 53,8%	6 46,2%	
Amoxicilina + ácido clavulânico	5 41,7%	3 25%	4 33,3%
Ampicilina			<b>12 100%</b>
Cefalotina	2 16,7%		10 83,3%
Cefepima	3 23,1%	4 30,8%	6 46,2%
Cefotaxima	2 16,7%		10 83,3%
Ceftazidima	3 23,1%	1 7,7%	9 69,2%
Cefuroxima	1 8,3%	1 8,3%	10 83,3%
Cefuroxima Axetil	1 8,3%	1 8,3%	10 83,3%
Ciprofloxacina	3 23,1%	3 23,1%	7 53,8%
Gentamicina	5 38,5%		8 61,5%
Levofloxacina	5 41,7%	2 16,6%	5 41,7%
Meropenemo	<b>13 100%</b>		
Nitrofurantoína	4 33,3%	6 50%	2 16,7%
Norfloxacina	1 8,3%		11 91,7%
Piperacilina/Tazobactam	12 92,3%	1 7,7%	
Tetraciclina	3 25%	1 8,3%	8 66,7%
Tobramicina	5 38,5%	2 15,4%	6 46,2%
Trimetoprim/Sulfametoxazol	4 30,8%		9 69,2%

Nota: apenas foram testados 12 isolados para a amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, cefalotina, cefotaxima, cefuroxima, cefuroxima axetil, levofloxacina, nitrofurantoína, norfloxacina e tetraciclina pelo que, nestes casos, o número total de espécies foi considerado 12.

Todos os isolados foram sensíveis ao meropenemo (carbapenemos). As maiores taxas de sensibilidade foram registadas na associação de um  $\beta$ -lactâmico com um inibidor das  $\beta$ -lactamases, piperacilina + tazobactam (n = 12 - 92,3%), onde não foi registado nenhum caso de resistência. Já no caso da combinação amoxicilina + ácido clavulânico, a taxa de sensibilidade não foi tão significativa (n = 5 - 41,7%) e foram detectados 4 isolados (33,3%) resistentes a esta combinação. É também importante realçar os 3 casos de sensibilidade intermédia encontrados (25%), o que quer dizer que a eficácia desta combinação nestes microrganismos pode estar a diminuir.

No que concerne às taxas de resistência, verificou-se que todos os isolados foram resistentes à ampicilina (aminopenicilina). Trata-se de uma resistência natural desta espécie. Detectaram-se também elevadas taxas de resistência à norfloxacin (84,6%) e às cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, e 3<sup>a</sup> geração com taxas de resistências que variam de 69,2%, nas cefalosporinas de largo espectro (ceftazidima) a 76,9% nas cefalosporinas de 1<sup>a</sup> geração (cefalotina). No caso da cefepima, cefalosporina de 4<sup>a</sup> geração, 6 dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* (46,2%) apresentaram resistência a este fármaco e em 4 deles (30,8%) a sensibilidade já se encontra reduzida. Provavelmente estes microrganismos estão a perder a sensibilidade aos grupos de cefalosporinas com espectros mais alargados, facto que pode não ser de bom prognóstico. A resistência ao grupo das cefalosporinas pode ser explicada pelo facto de estes microrganismos produzirem  $\beta$ -lactamases capazes de hidrolisar estes antibióticos – cefalosporinas AmpC.

Dos 13 microrganismos isolados, 10 são produtores de ESBL's (76,9%). Trata-se de um número bastante elevado e preocupante. Estes microrganismos produtores de ESBL's são, hoje em dia, reconhecidos a nível global como a maior causa de infecções nosocomiais. Esta emergência surge devido a mutações nos genes que codificam as  $\beta$ -lactamases TEM-1, TEM-2 ou SHV-1 e são comumente encontradas nos membros da família Enterobacteriaceae, especialmente em *E.coli* e *Klebsiella spp.* Um estudo já mencionado anteriormente, realizado no período entre o ano de 2004 a 2006, e onde foram analisadas espécies produtoras de ESBL's em diferentes zonas geográficas, revelou que a frequência de espécies produtoras de ESBL's era maior em *Klebsiella pneumoniae* do que em *E.coli*. Revelou também que as zonas do mundo em que há maior frequência de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL's são a América do Sul e Ásia. Na Europa e América do Norte a frequência de espécies produtoras de ESBL's é muito inferior (Coque, T. M. *et al.* 2008).

### **9. *Proteus mirabilis***

Neste estudo foram identificados 11 isolados (5,9%) de *Proteus mirabilis* em 8 doentes diferentes. Trata-se de um bacilo Gram negativo, pertencente à família

*Enterobacteriaceae*. É muito móvel, está frequentemente associado a infecções urinárias (coloniza frequentemente sondas vesicais) mas é também um importante agente causador de infecções nosocomiais.

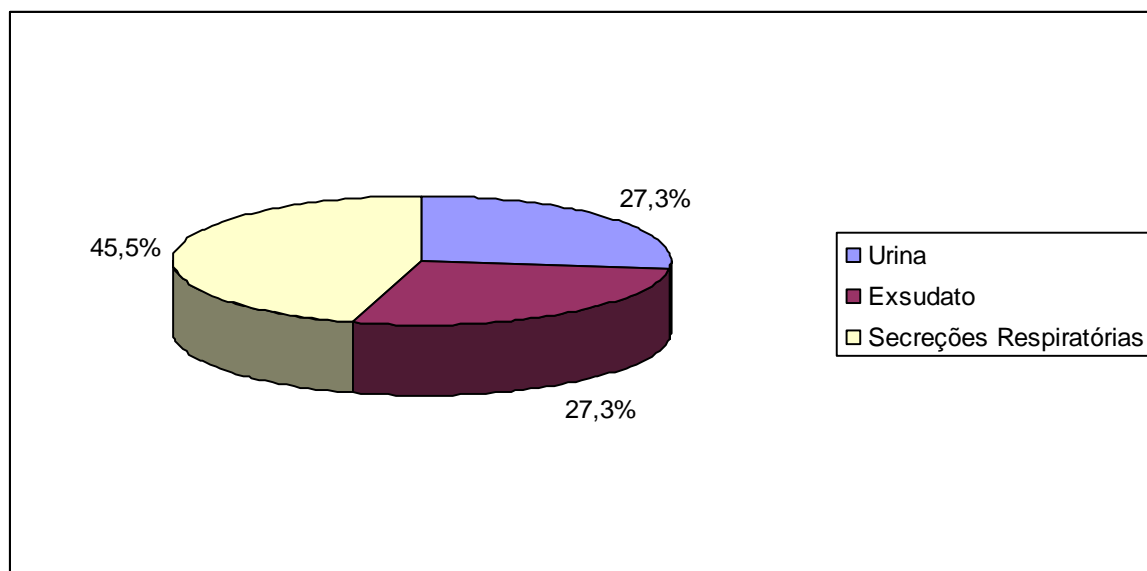


Figura 26: Distribuição dos isolados de *Proteus mirabilis* de acordo com o local de infecção: urina; exsudato e secreções respiratórias.

Ao contrário do que está descrito na literatura, a maior percentagem dos microrganismos foram isolados em secreções respiratórias (5 espécies), tal como se mostra na Figura 26. No entanto não se podem tirar muitas conclusões, uma vez que o número de isolados foi baixo e, no caso das secreções respiratórias, dois dos isolados pertencem ao mesmo doente.

A maior taxa de infecção foi registada no serviço de Oncologia Médica (45,5%), seguido dos serviços de Cirurgia Cabeça e Pescoço (27,3%), Cuidados Paliativos (18,2%) e Radioterapia (9,1%). A infecção foi mais incidente nos homens ( $n = 6 - 75\%$ ) do que nas mulheres ( $n = 2 - 25\%$ ).

Tabela 15: Perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos dos isolados de *Proteus mirabilis*.

	Sensível	Sensibilidade Intermédia	Resistente
Amicacina	10 90,9%	1 9,1%	
Amoxicilina + ácido clavulânico	5 45,5%	5 45,5%	1 9,1%
Ampicilina	2 8,2%)		9 81,8%
Cefalotina	9 1,8%	1 9,1%	1 9,1%
Cefepima	<b>11 100%</b>		
Cefotaxima	10 90,9%	1 9,1%	
Ceftazidima	<b>11 100%</b>		
Cefuroxima	10 90,9%		1 9,1%
Cefuroxima Axetil	10 90,9%		1 9,1%
Ciprofloxacina	6 54,5%		5 45,5%
Gentamicina	6 54,5%		5 45,5%
Levofloxacina	6 54,5%	2 18,2%	3 27,3%
Meropenemo	<b>11 100%</b>		
Nitrofurantoína			<b>11 100%</b>
Norfloxacina	6 54,5%		5 45,5%
Piperacilina/Tazobactam	<b>11 100%</b>		
Tetraciclina			<b>11 100%</b>
Tobramicina	6 54,5%	2 18,2%	3 27,3%
Trimetoprim/Sulfametoxazol	3 27,3%		8 72,7%

Analisando os dados da Tabela 15, verifica-se que todos os isolados de *Proteus mirabilis* foram sensíveis à amicacina, às cefalosporinas de 3ª (cefotaxima e ceftazidima) e 4ª geração (cefepima), aos carbapenemos (meropenemo) e à combinação de um  $\beta$ -lactâmico com um antibiótico inibidor das  $\beta$ -lactamases (Piperacilina/Tazobactam). Detectou-se também elevada sensibilidade à amicacina (n = 10 – 90%) e às cefalosporinas de 2ª geração (cefuroxima, cefuroxima axetil) (n = 10 - 90,9%). No caso da combinação amoxicilina/ácido clavulânico é importante referir que apenas 5 (45,5%) das espécies isoladas foram sensíveis a esta combinação  $\beta$ -lactâmico + antibiótico inibidor das  $\beta$ -lactamases, sendo um isolado resistente (9,1%) e os outros 5 apresentaram sensibilidade intermédia 5 (45,5%). De notar que nalguns casos, a sensibilidade intermédia pode representar um ponto de viragem para a resistência, sinal de que os antibióticos poderão estar a perder a sua eficácia devido à aquisição de resistências por parte dos microrganismos.

Os isolados selvagens de *Proteus mirabilis* são susceptíveis aos  $\beta$ -lactâmicos. No entanto, estudos revelam que tem vindo a registar-se um aumento de espécies de *Proteus mirabilis* que adquiriram  $\beta$ -lactamases, nomeadamente  $\beta$ -lactamases de largo espectro e cefalosporinas (AmpC), tornando-as assim resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos. A resistência à amoxicilina deve-se principalmente à acção das penicilinas TEM-1 e TEM-2, sendo esta última mais comum nestas espécies (Aragón L.M., *et al.* 2008).

Neste estudo verificou-se uma pequena percentagem de isolados resistentes às cefalosporinas e uma resistência significativa aos  $\beta$ -lactâmicos.

Todos os isolados foram resistentes à nitrofurantoína (resistência natural) e à tetraciclina. A nitrofurantoína é mais activa em pH ácido do que em pH alcalino, e por isso, em infecções urinárias por microrganismos produtores de urease a sua acção é bastante limitada, devido à subida do pH urinário. Não tem, por este motivo, actividade contra *Proteus spp.* (Bean, D. C. *et al.* 2008). Registou-se também uma elevada resistência aos antibióticos antimetabolitos (72,7%) (trimetoprim/sulfametoxazol) e à ampicilina (81,8%). No que diz respeito às quinolonas testadas, norfloxacin, ciprofloxacina e levofloxacina, também se denota uma baixa susceptibilidade a estes antibióticos, uma vez que as espécies isoladas não tiveram taxas muito elevadas no que toca à sensibilidade às quinolonas - 54,5%, 54,5% e 54,5, respectivamente.

Num estudo feito num hospital português (Centro Hospitalar do Nordeste – Unidade Hospitalar de Bragança), no qual foram analisadas todas as espécies de *Proteus mirabilis* isoladas em urinas (quer de doentes de ambulatório, quer de doentes de internamento) no período de Abril de 2004 até Março de 2006, concluiu-se que os antibióticos mais eficazes contra estes microrganismos são o meropenem e a amicacina e o menos eficaz é a nitrofurantoína. Estas conclusões estão de acordo com os resultados encontrados neste trabalho (não foi testado o meropenem, mas foi o imipenem que faz igualmente parte do grupo dos carbapenemos).

## 10. *Acinetobacter baumannii*

Foram identificados apenas 2 isolados *Acinetobacter baumannii*. No entanto, dado ser um microrganismo muito resistente e envolvido em surtos infecciosos a nível hospitalar, é importante falar dele. Estudos mostram que há uma associação entre infecções por *Acinetobacter baumannii* e o aumento das taxas de mortalidade/tempo de internamento em doentes hospitalizados.

*Acinetobacter baumannii* é uma bactéria Gram negativo aeróbia, não fermentadora e ubíqua na natureza, especialmente em locais húmidos. É um microrganismo capaz de contaminar e persistir em várias superfícies, tendo um elevado grau de disseminação. Tem sido descrito como uma espécie que frequentemente coloniza e infecta doentes de unidades de cuidados intensivos e a nível hospitalar pode apresentar vários perfis de resistência aos antibióticos, sendo-lhe atribuída uma morbilidade significativa. É um causador comum de sépsis, pneumonia e infecções urinárias no decorrer do internamento de doentes em estado grave. Considera-se que as estirpes de *Acinetobacter baumannii* são multiresistentes quando são resistentes a mais do que três classes de antibióticos, sendo que a resistência aos carbapenemos é suficiente para considerar estas espécies como altamente resistentes. Considera-se que é necessária uma MIC igual a 16 µg/L de imipenemo ou meropenemo para definir a resistências destas bactérias aos carbapenemos (Romanelli, R.M. *et al.* 2009).

Os dois microrganismos foram isolados de sangue e de um exsudato de dois doentes do sexo masculino. Ambas os isolados demonstraram uma elevada resistência aos antibióticos testados, sendo um deles multiresistente. Embora não fosse significativo o número de isolados de *Acinetobacter baumannii* (n = 2), não deixa de ser preocupante as resistências encontradas a vários antibióticos e grupos de antibióticos, o que vem realçar o perigo de um surto associado a este microrganismo.

Resumindo, *Acinetobacter baumannii* é um importante microrganismo emergente devido à multiresistência (principalmente devido à aquisição de elementos genéticos –



plasmídeos que contêm genes de resistência às metalo-  $\beta$ -lactamases) e à dificuldade de controlar os surtos (consegue sobreviver em condições muito adversas e durante muito tempo). O facto de serem apenas dois isolados de *Acinetobacter baumannii* e em meses e enfermarias diferentes (Novembro; Janeiro e Oncologia Médica; Radioterapia) é um factor bastante positivo, devido ao seu baixo número e, provavelmente, poder-se-á descartar a possibilidade de um surto desta bactéria no hospital.

A prevenção da disseminação deste microrganismo é o principal objectivo do controlo da infecção. As medidas a tomar para prevenir a disseminação desta bactéria são: culturas microbiológicas de prevenção; evitar transmissões interpessoais; efectuar estatísticas periodicamente (estudos de prevalência); identificação da fonte de infecção e controlo microbiológico ambiental. Os principais riscos para o desenvolvimento de infecções por *Acinetobacter baumannii* são: uso de cateteres venosos centrais; ventilação mecânica em doentes com patologia respiratória; infecções anteriores; uso prévio de antibióticos (especialmente carbapenemos) e gravidade da patologia de base. Estes factores de risco devem ser os mais analisados nas acções de controlo de infecção e a identificação de doentes colonizados por *Acinetobacter baumannii* é de extrema importância para prevenir a disseminação deste microrganismo (Romanelli, R.M. *et al.* 2009).



## **Conclusões Finais**



Do presente estudo podem-se inferir as seguintes conclusões:

- Dos 187 microrganismos isolados, de doentes oncológicos internados, os bacilos Gram negativo que apareceram mais frequentemente foram: *E.coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Os cocos Gram positivos mais frequentemente isolados foram: *Staphylococcus coagulase negativo*; *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Também foram isoladas algumas espécies de *Candida spp.* O microrganismo que surgiu com maior frequência foi *E.coli* (na maioria dos casos associado à infecção urinária).

- No período do estudo registaram-se 3212 internamentos. Pode dizer-se que o facto de se ter isolado 187 microrganismos em 106 doentes estudados não é um dado alarmante, mesmo tendo em conta de que se tratam de doentes oncológicos com maior susceptibilidade para a infecção. A percentagem de infecção foi de cerca de 3,3%, o que é um número muito baixo. Provavelmente, os factores que contribuem para este número são os seguintes: boa prática no que concerne aos cuidados de saúde prestados (formação do pessoal, boa higienização – lavagem das mãos, esterilização do material e instalações); períodos de visitas controlados; ausência de urgência externa; dimensão do hospital; curto período de internamento pré-cirurgia e relação estreita entre o laboratório e o clínico.

- O tipo de infecção mais comum foi a; infecção respiratória. Seguem-se a infecção urinária e a infecção sanguínea.

A população em estudo engloba um grupo de doentes sujeitos a procedimentos invasivos, muitos deles anteriormente submetidos a cirurgia e/ou como a presença de dispositivos médicos, principalmente cateteres venosos periféricos e centrais, sondas vesicais, sondas entéricas e quase todos imunocomprometidos (doentes oncológicos sujeitos a tratamentos de quimioterapia). Estes factores fazem deste tipo de doentes um grupo muito mais susceptível a contrair uma infecção nosocomial.

- Foi no serviço de Oncologia Médica que se detectou maior taxa de infecção.

- A infecção no sexo masculino foi mais prevalente relativamente ao sexo feminino. Aparentemente não existem explicações para fundamentar este resultado, mas é importante ter em conta que não se sabe o número total de doentes internados do sexo masculino e feminino durante o período em que decorreu o estudo. Por outro lado, dos 106 doentes estudados 63 são homens e 43 são mulheres, o que aumenta a probabilidade de infecção ser maior no sexo masculino.

- A média de idade da população estudada é de 62,9 anos. Verifica-se um aumento da esperança média de vida e o consequente aumento da proporção de pessoas idosas. De um modo geral, as pessoas idosas têm maior susceptibilidade às infecções do que os jovens adultos. É sabido que o envelhecimento está associado à disfunção do sistema imune, ao aumento da frequência da diabetes mellitus, menor tolerância a procedimentos terapêuticos, aumento do tempo de hospitalização e uso de antibióticos (factores que predispõe para a IH). Dados recentes indicam que 54% das infecções em adultos surgem em doentes com mais de 65 anos de idade. Assim, a IH nas pessoas idosas, nos países desenvolvidos, é um problema de saúde pública e um desafio crescente em termos de intervenção clínica.

- É também pertinente o facto de alguns dos doentes estudados terem internamentos em mais do que um serviço do hospital, durante o período do estudo. Esta realidade requer especial atenção no que toca à eventual disseminação de microrganismos resistentes aos antibióticos pelos diferentes serviços do hospital.

- As resistências mais frequentemente encontradas foram, para os bacilos Gram negativo: *Klebsiella pneumoniae* resistentes à norfloxacina e cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, e 3<sup>a</sup> geração e *Proteus mirabilis* resistente à tetraciclina e ampicilina. *E.coli* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram baixas taxas de resistência aos antibióticos (inferiores a 58,6% e 41,7% respectivamente).

- 20% dos isolados de *E.coli* e 76,9% das espécies isoladas de *Klebsiella pneumoniae* são produtores de ESBL's. No conjunto são números preocupantes uma vez que estes microrganismos são os principais agentes causadores de IH e as ESBL's

emergiram como um importante mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, criando assim problemas graves a nível terapêutico (esgotamento e/ou diminuição de opções terapêuticas, que conduzem ao inevitável aumento do tempo e custo dos internamentos). A elevada percentagem de microrganismos produtores de ESBL's enfatiza a importância da utilização dos métodos de detecção de espécies produtoras destas enzimas, na rotina hospitalar, de modo a minimizar as falhas terapêuticas.

- Nos cocos Gram positivos as resistências mais detectadas foram *Staphylococcus* coagulase negativa resistentes à benzilpenicilina e oxacilina; *S.aureus* resistentes à benzilpenicilina, à oxacilina, aos antibióticos grupo MLS e quinolonas e *Enterococcus faecalis* resistentes às cefalosporinas de 2ª geração; clindamicina, tetraciclina e quinupristina/dalfopristin.

- Dos *S.aureus* isolados, 79,2% são MRSA. Trata-se de um número muito elevado, tendo em conta a média nacional na ordem dos 53% (que já é um número preocupante). Numa instituição hospitalar a transmissão destes microrganismos ocorre, principalmente, de um doente colonizado ou infectado para outro doente, através das mãos dos profissionais. Por outro lado, uma percentagem importante de pacientes não hospitalizados que teve ou mantém estreito contacto com os Serviços de Saúde colonizado, funciona como reservatório e vector do MRSA.

A prevenção e o diagnóstico são medidas cruciais para a diminuição da prevalência dos MRSA. A prevenção passa pela adopção de medidas de controlo de infecção, cujo sucesso depende do conhecimento dos mecanismos de resistência e, em especial, da epidemiologia local do microrganismo e suas resistências.

- O controlo da IH é indispensável. O controlo da IH e a prestação de cuidados de saúde com qualidade e a um custo razoável contribuem para a diminuição do consumo de antibióticos (e consequentemente na emergência de resistência aos mesmos) e na contenção de custos na saúde. O contributo do laboratório no controlo da IH reveste-se assim de uma enorme importância: quanto melhor se conhecer os microrganismos mais prevalentes na IH e as resistências associadas mais célere e eficaz será a antibioterapia escolhida (controlo e/ou diminuição das resistências aos antibióticos a nível hospitalar).

Por outro lado, o papel do laboratório passa também por ajudar na determinação do foco de infecção e possíveis modos de transmissão.



## **Bibliografia**



- Abdel –Fattah (2005). “Surveillance of nosocomial infections at a Saudi Arabian military hospital for a one-year period” GMS German Medical Science 2005. Vol 3, ISSN 1612-3174.
- Andersen, Bjorg, *et al* (2009). “Hospital-acquired infections before and after healthcare reorganization in a tertiary university hospital in Norway” Journal of Public Health. Vol.31, No. 1, pp. 98-104.
- Andrade, Denise, *et al*. (2000). “Microbiological condition of hospital beds before and after terminal cleaning” Journal of Public Health. Vol. 34, No. 2, p. 163-9.
- Aragón L.M., *et al*. (2008). “Increase in beta-lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M- and CMY-type as well as new VEB- and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases.” The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61(5):1029-1032.
- Autiero, I. *et al*. (2009). “Modeling of the Bacterial Mechanism of Methicillin-Resistance by a Systems Biology Approach.” PLoS ONE 4 (7).
- Bean, D. C. *et al*. (2008). “Antimicrobial resistance in community and nosocomial *Escherichiacoli* urinary tract isolates, London 2005 – 2006” Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 18;7:13.
- Barry, P. M., *et al*. (2009). “The use of cephalosporins for gonorrhea: The impending problem of resistance.” Expert Opin Pharmacother 10(4): 555-577.
- Bergogne – Bérézin, E. (1995). “Les infections nosocomiales: nouveaux agents, incidence, prévention” Press méd. 24: 89-97.
- Bodey, G.P. 1997. “The Evolution of Antibiotic Therapy for Neutropenic Patients.” Clinical Cancer Research 2660 Vol. 3, 2660-2665.
- Brink, A. J. *et al*. (2004). “Appropriate Use of the Carbapenems.” SA Medical Association Health and Medical Publishing Group Volume 94, No. 10 , 857-861.
- Bush, K. *et al*. (2010). “Updated functional classification of beta-lactamases.” Antimicrob Agents and Chemotherapy 969-976.
- Choi, H.K. *et al*. (2009). “Blood Stream Infections by *Cândida glabrata* and *Cândida krusei*: A Single-Center Experience.” The Korean Journal of Internal Medicine Vol. 24, No. 3 263-269.
- Chung, A. (2010). “Bacterial cystitis in women.” Australian Family Physician 39 (5): 295-8.
- Coque, T. M. *et al*. (2008). “Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe.” Euro Surveillance 13 (47) pii: 19044.
- Correia, C. *et al*. (2007). “Etiology of urinary tract infections and antimicrobial susceptibility of urinary pathogens” Acta Médica Portuguesa 20: 543 – 549.
- Davis, D. *et al*. (2001). “Enterococcus faecalis Multi-Drug Resistance Transporters: Application for Antibiotic Discovery.” Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 3 (2): 179 - 184
- De Moraes, *et al*. (2000). “Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a university hospital from Brazil.” Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 42 (4): 201 – 207.
- Dundar, D. *et al*. (2010). “In-vitro efficacy of synergistic antibiotic combinations in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains.” Yonsei Medical Journal. 31;51(1):111-6
- Emori, T. Grace *et al*. (1993). “An Overview of Nosocomial Infections, Including the role of the Microbiology Laboratory.” Clinical Microbiology Reviews. P. 428-442.

- Enrigh, M. C. (2003). "The evolution of a resistant pathogen – the case of MRSA." Current Opinion in Pharmacology 3:474-479.
- Finks, J. *et al.* (2009). "Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Michigan USA, 2007." Emerging Infectious Diseases Vol. 15, No. 6 943-945.
- Frost, L.S. (2005). "Mobile Genetic Elements: the Agents of Open Source Evolution." Nature Publishing Group Vol. 3 p. 722-732.
- Gamero Delgado M.C. *et al.* (2007). "Susceptibility and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobial agents." Revista Española de Quimioterapia 20(2):230-3.
- Golemi-Kotra D *et al.* (2003). "Resistance to beta-lactam antibiotics and its mediation by the sensor domain of the transmembrane BlaR signaling pathway in *Staphylococcus aureus*." The Journal of Biological Chemistry Vol. 278, No. 20 18419-18425.
- Hancock R.E. (2006). "The complexities of antibiotic action." Molecular Systems Biology Article number 142, doi: 10.1038/msb4100184.
- Hecker M. T. *et al.* (2003). "Unnecessary Use of Antimicrobials in Hospitalized Patients." Arch Intern Med. Vol. 163; 972-978.
- Heijenoort, J. (2001). "Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptoglycan." Glycobiology vol.11 no3 pp. 25R-36R.
- Horan, Teresa C. *et al* (1986) "Nosocomial Infection Surveillance, 1984." Surveillance Summaries 35 (SS-1); 17-29.
- Joly-Guillou M.L 2010). "Comparative in vitro activity of Meropenemo, Imipenemo and Piperacillin/tazobactam against 1071 clinical isolates using 2 different methods: a French multicentre study." BMC: Infectious disease 18;10:72.
- Kallel H. *et al.*, (2008). "Correlation between antibiotic use and changes in susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in a medical-surgical intensive care unit." Indian Journal of Critical Care Medicine 12(1):18-23.
- Kapoor, S. *et al.* (2004) "Aztreonam" Indian Pediatrics 41:359-3364.
- Khanfar H. S. *et al.* (2009). "Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings." Journal of Infection in developing countries 1;3 (4): 295-9.
- Lepape, A. *et al.* (2009). "Experience of European Intensive Care Physicians With Infections due to Antibiotic-Resistant Bacteria, 2009" Euro Surveill. 14(45): pii=19393.
- Leung, S. S. F., *et al.* (2009). "Vancomycin resistance: Modeling backbone variants with D-Ala-DAla and D-Ala-D-Lac peptides." Bioorg Med Chem Lett. 15; 19(4): 1236–1239.
- Livermore, D. M. (2003). "Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact." Clinical Infectious Diseases 36 (Suppl 1): S11-23.
- Lyman, Gary H. (2010). "How We Treat Febrile Neutropenia in Patients Receiving Cancer Chemotherapy." Journal of Oncology Practice Vol. 6, Issue 3.
- Messai, Y. *et al.* (2006). "Prevalence of beta-lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers." Revista Española de Quimioterapia 19(2):144-151.

- Miyawaki, Koji *et al.* (2010). "The Impact of Antimicrobial Stewardship by Infection Control Team in a Japanese Teaching Hospital." The Pharmaceutical Society of Japan 130 (8) 1105-1111.
- Nicolas-Chanoine (1997). "Inhibitor-resistant beta-lactamases." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 40, 1–3.
- Nicolaou, K. C. *et al* (2009). "Recent Advances in the Chemistry and Biology of Naturally Occurring Antibiotics". Angew Chem Int Ed Engl. 2009;48(4):660-719.
- Palavra, Filipe *et al.* (2010). "Infecção nosocomial associada aos cuidados de saúde Problema emergente num serviço de neurologia" Acta Med Porto; 23: 613-624.
- Pasqualotto, A.C. *et al.* (2006). "Candidaemia and cancer: patients are not all the same." BMC Infectious Diseases 6:50
- Pereira, M. P. *et al.* (2004). "Third generation cephalosporin use in a tertiary hospital in Porto f Spain, Trinidad: need for an antibiotic policy" BMC Infectious Diseases 4:59.
- Périchon, B. *et al.* (2009). "VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol. 53, No. 11 p. 4580–4587.
- Prabhash, K. *et al.* (2010). "Blood stream infections incancer patients: a single center experience of isolates and sensitivity pattern." Indian Journal of Cancer 47 (2): 184-8.
- Rabagliati, Ricardo B. *et al.* (2008). "Etiología de episodios de neutropenia febril en pacientes adultos con cáncer hematológico y de órganos sólidos en elHospital Clínico Universidad Católica, Santiago – Chile" Rev Chil Infect; 26 (2): 106-113.
- Raghunath, D. (2008). "Emerging antibiotic resistance in bacteria with special reference to Índia" J. Biosci. 33 (4) 593-603.
- Rahnama'i, M. S. *et al* (2009). "Amoxicillin/clavulanate (Augmentin) resistant *Escherichia coli* in bacterial peritonitis after abdominal surgery--clinical outcome in ICU patients." Netherlands Journal of Medicine 67(5):173-6.
- Rodloff A. *et al.* (2008). "Susceptible, intermediate, and resistant - the intensity of antibiotic action." Deutsches Arzteblatt International 105(39):657-62.
- Rolinson G. N. (1998). "Forty years of beta-lactam research." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 41(6):589-603.
- Romanelli, R.M. *et al.* (2009). "Outbreak of resistant *Acinetobacter baumannii*- measures and proposal for prevention and control." The Brazilian Journal of Infectious Diseases 13(5):341-7.
- Scheffers, D.J. *et. al* (2005). "Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies" Microbiology and Molecular Biology Reviews p. 585–607.
- Schito G.C. (2006). "The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*." Clinical Microbiology an Infectious Diseases 12, 1:3-8.
- Smet, A. *et al.* (2008). "Diversity of Extended-Spectrum \_-Lactamases and Class C- Lactamases among Cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian Broiler Farms" Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 52, No. 4 1238–1243.
- Smith, D.L. *et al.* (2005). "Agricultural Antibiotics and Human Health." PLoS Med 2(8): e232.

- Sotto, A. *et al.* (2001). "Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study." Journal of Clinical Microbiology 39 (2): 438-44.
- Sousa, J. C. (2006). "Manual de Antibióticos Antimicrobianos" Edições Universidade Fernando Pessoa; 2ª Edição; p 71-75 e 111-127.
- Spengler, P. J. (1980). "Comparative study of bacampicilililn and ampicilin in the teatment of uncomplicated gonorrhoea". The British Journal of Venereal Diseases 56:151-155.
- Tavares DA, *et al.* (2010). "Large screening of CA-MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing healthy young children living in two areas (urban and rural) of Portugal." BMC Infectious Diseases 3; 10:110.
- Tenover, F. C. 2006. "Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bactéria" The American Journal of Medicine Vol. 119 (6A), S3–S10.
- Thomas, C. R. *et al.* (1994). "Common Emergencies in Cancer Medicine: Infectious and Treatment – Related Syndromes, part I & II" Journal of the National Medical Association; Vol. 86. No. 10; 765-774 e 839-852.
- Tunger, Ozlem *et al.* (2009). "Rational antibiotic use" J Infect Developing Countries 3(2): 88-93.
- Zhang Y. *et al.* (2006). "Rational antibiotic use in China: lessons learnt through introducing surgeons to Australian guidelines" Australia and New Zealand Health Policy 3:5.